

DESOXYRIBONUCLEOTIDSTOFFWECHSEL IM WEIZEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Heidrun Müller
aus Leonberg

Marburg/Lahn 1977

DESOXYRIBONUCLEOTIDSTOFFWECHSEL IM WEIZEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Heidrun Müller
aus Leonberg

Marburg/Lahn 1977



Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 22. 4. 1977

Tag der mündlichen Prüfung 04. 5. 1977

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Zellzyklus und molekularbiologische Ereignisse während der frühen Keimungs- phase von Weizenembryonen - Zielsetzung dieser Arbeit	1
1.2 Ribonucleotidreduktasen	7
1.3 Desoxyribonucleosidtriphosphate in der intakten Zelle	8
1.4 Ribonucleotidreduktasen und Desoxyribo- nucleosidtriphosphat-Bestimmungen in pflanzlichen Zellen	11
2. <u>Experimenteller Teil</u>	13
2.1 Pflanzenmaterial	13
2.1.1 Vernalisation	13
2.1.2 Handisolierung von Weizenembryonen	13
2.1.3 Embryonenisolierung nach Johnston & Stern	14
2.1.4 Aufschluß des Pflanzenmaterials	15
2.2 Ribonucleotidreduktase-Test	15
2.2.1 Inkubation	15
2.2.2 Papierchromatographische Analyse	16
2.2.3 Säulenchromatographische Analyse	17
2.3 DNA-Markierung	18
2.3.1 Nucleosid-Einbau	18
2.3.2 Extraktion und Reinigung der DNA	18
2.3.3 Basen-Analyse	20

2.4	dATP- und dTTP-Bestimmungen	21
2.4.1	Extraktion der Nucleotide	21
2.4.2	dNTP-Bestimmung	22
2.5	DNA-Bestimmung	24
2.5.1	Extraktion der DNA	24
2.5.2	Fluoreszenzspektroskopische DNA-Messungen	25
2.6	Allgemeine Methoden	26
2.6.1	Spektralphotometrische Bestimmungen	26
2.6.2	Radioaktivitätsmessung	27
2.6.3	Chromatographische Trennmethoden für Nucleotide	27
2.6.4	Bestimmung von ATP mit Luciferin/Luciferase	28
3.	<u>Ergebnisse</u>	29
3.1	Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Weizenextrakten	29
3.1.1	Ribonucleotidreduktase aus Embryonen alter Weizensamen	29
3.1.2	Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Extrakten aus Embryonen frischer Weizensamen	38
3.1.3	Vernalisation und Ribonucleotid- reduktase-Aktivität	39
3.1.4	Bildung eines unbekannten Nucleotids während des Ribonucleotidreduktase- Tests mit Weizenextrakten	44
3.2	DNA-Markierung durch Ribonucleoside	47
3.2.1	Radioaktivitätseinbau, Reinigung und Charakterisierung der DNA	48
3.2.2	Zeit- und Altersabhängigkeit	54
3.3	dATP- und dTTP-Bestimmung in Extrakten aus Weizenembryonen	60

3.3.1	Standardbedingungen für die Polymerase-Reaktion	60
3.3.2	Extraktion von dATP und dTTP	64
3.3.3	dATP- und dTTP-Poolgrößen	71
3.3.4	ATP-Gehalt von Weizenembryonen	74
4.	<u>Diskussion</u>	76
4.1	Wahl des Untersuchungsobjektes	76
4.2	Charakterisierung der Weizen-Ribo- nucleotidreduktase	78
4.3	Zeit- und Altersabhängigkeit	81
4.4	Die physiologische Bedeutung des Desoxyribotid-Pools	85
5.	<u>Zusammenfassung</u>	91
6.	<u>Literatur</u>	93



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555607_0016

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ATP, ADP, AMP	Adenosin-5'-tri-, -di-, -monophosphat
dATP, dADP, dAMP	Desoxyadenosintri-, -di-, -monophosphat
Ci	Curie = $2,22 \times 10^{12}$ dpm
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTP, CDP, CMP	Cytidin-5'-tri-, -di-, -monophosphat
dCTP, dCDP, dCMP	Desoxycytidintri-, -di-, -monophosphat
Cyd	Cytidin
D	spezifische Dichte
2,4 D	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dpm	Zerfälle pro Minute
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GTP, GDP, GMP	Guanosin-5'-tri-, -di-, -monophosphat
dGTP, dGDP	Desoxyguanosintri-, -diphosphat
Hepes	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
IMP	Inosin-5'-monophosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260 nm
PEI-Cellulose	Polyäthylenimin-Cellulose
Poly(dA-dT)	Polydesoxyadenylsäure-Polydesoxythymidylsäure
POPOP	1,4-Di-2(5-phenyloxazolyl)benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	"messenger"-(Boten-) Ribonucleinsäure

rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
RNase A	Pankreas-Ribonuclease A
RRase	Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std. (h)	Stunde
Tab.	Tabelle
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
dTTP, dTDP, dTMP	Desoxythymidintri-, -di-, -monophosphat
U	"Unit", Enzymeinheit
UTP, UDP, UMP	Uridin-5'-tri-, -di-, -monophosphat
dUTP, dUDP, dUMP	Desoxyuridintri-, -di-, -monophosphat
UV-Licht	Ultraviolette Licht

1. Einleitung

1.1 Zellzyklus und molekularbiologische Ereignisse während der frühen Keimungsphase von Weizen- embryonen - Zielsetzung dieser Arbeit -

Die Existenz jeder Zelle ist eng verknüpft mit der Fähigkeit zur Zellteilung und Zelldifferenzierung. Der Vorgang der Zellvermehrung kann überhaupt als die wichtigste Voraussetzung für das Überleben der Zelle betrachtet werden. Unter gewissen Umständen kann eine Zelle ihre Stoffwechselaktivitäten stark einschränken. Solche von der vegetativen Zelle verschiedenen Systeme stellen beispielsweise die Sporen von Bakterien und die ruhenden Embryonen von trockenen Pflanzensamen dar, die längere Zeit ohne Zellvermehrung lebensfähig bleiben können. Wird dieser Zustand jedoch nicht nach einer bestimmten Zeit beendet, bedeutet dies den Tod für die Zellen.

Die biosynthetische Aktivität der Zellen wird von der Übertragung bzw. Bewahrung genetischer Information geprägt. Während alle lebenden Organismen auf molekularer und biochemischer Ebene erstaunlich ähnlich sind, gibt es doch wichtige und grundlegende Unterschiede zwischen Prokaryonten einerseits und Eukaryonten andererseits. Derartige Unterschiede bestehen etwa im dynamischen Verhalten der Zelle, der Art und Weise wie verschiedene Ereignisse des Zellzyklus ablaufen, dem Phänomen der Zellregulation¹. So ist im Gegensatz zu den prokaryotischen Einzellern die Zellteilung in Geweben höherer Organismen hoch spezialisiert und muß immer eine gesonderte DNA-Synthesephase vor der Mitose aufweisen. Wie zuerst von Howard und Pelc² an pflanzlichen Zellen gezeigt wurde, kann der Zellzyklus in vier exakt aufeinanderfolgende Perioden G_1 , S, G_2 , D eingeteilt werden (Abb. 1). Die S-Phase ist von Perioden ohne DNA-Replikation den G- oder "gap"-Phasen getrennt.

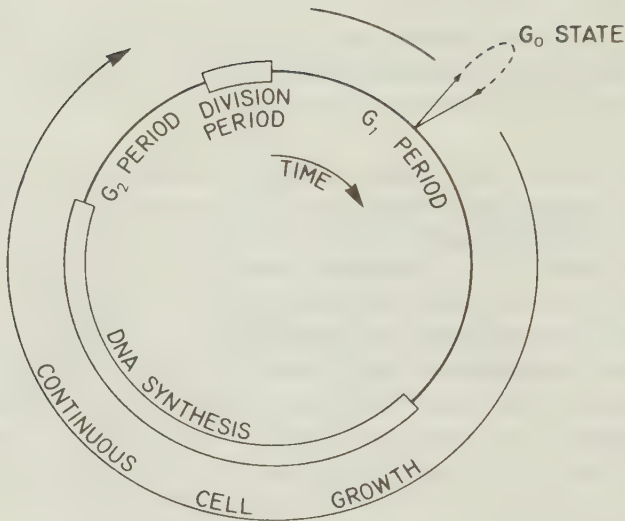


Abb. 1: Perioden des Zellzyklus (aus Prescott ⁴⁰⁾)

Das Intervall zwischen der Vervollständigung der Zellteilung und dem Beginn der DNA-Replikation wird G_1 genannt. G_2 ist die Periode zwischen dem Ende der DNA-Replikation und dem Beginn der Mitosephase (D). Über das molekulare Geschehen während der beiden G-Phasen bestehen nur lückenhafte Kenntnisse. In G_1 , so vermutet man allgemein, finden spezifische Ereignisse (z. B. rRNA-Synthese) statt, die Voraussetzung für den Beginn der DNA-Synthese sind.

Die Entdeckung, daß Zellen sich unter normalen Bedingungen oft nicht teilen, hat zur Einführung des Begriffs G_0 geführt ³. Meist geschieht diese Unterbrechung des Zellzyklus an einer bestimmten Stelle in der G_1 -Phase. In diesem Zusammenhang sind die Verhältnisse bei Pflanzenembryonen ein besonders schönes Beispiel. In einem ruhenden

Samen bleiben die Zellen des Pflanzenembryos in einem G_0 -Zustand ⁴. Dieser wird unter günstigen Keimungsbedingungen aufgehoben, und nach kurzer Zeit tritt ein hoher Prozentsatz der Zellen in die S-Phase ein und durchläuft den ersten Zellzyklus synchron. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich daher mit der Abfolge biosynthetischer Ereignisse in den ersten Phasen der Keimung. Auf welche Weise der günstigen Keimungsbedingungen ausgesetzte Samen von einem ruhenden Zustand zu einem hoch aktiven Metabolismus übergeht, ist Gegenstand zunehmenden Interesses. Das System des keimenden Weizenembryos gilt seit längerer Zeit als geeignet, die Voraussetzungen für den Beginn der DNA-Synthese zu studieren und nach Beziehungen zwischen der Replikation und den daran beteiligten Enzymen zu suchen.

Initiiert durch die Wasseraufnahme der Weizenembryonen erfolgt die Aktivierung des Genoms "kaskadenartig" ⁵, und die de novo-Synthese der wichtigsten Makromoleküle innerhalb der ersten 24 Stunden wird in der folgenden Sequenz in Gang gesetzt: mRNA - Proteine - DNA - rRNA - tRNA. Am Ende dieses Zeitraumes wird das erste Maximum der Zellteilung erreicht (Abb. 2).

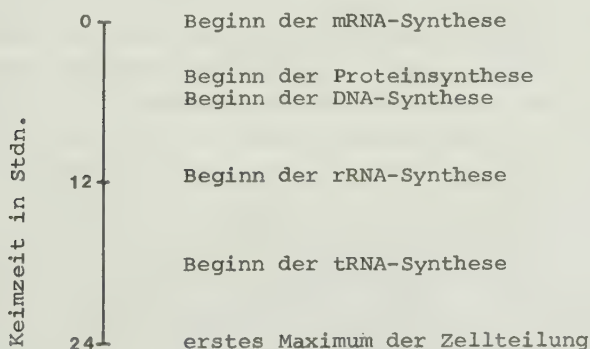


Abb. 2: Reihenfolge der Biosynthese von Makromolekülen während der frühen Keimungsphase von Weizenembryonen (nach Buchowicz et al. ⁵).

Während Buchowicz eine sehr früh einsetzende mRNA-Synthese nachweisen konnte, haben andere Autoren gezeigt, daß mit einer Transkription erst viele Stunden nach dem Beginn der Keimung zu rechnen ist. Sie nehmen an, daß die Proteinsynthese zunächst unter Verwertung der bereits im ungekeimten Embryo gespeicherten mRNA über die Translation kontrolliert wird und erst nach 12 Stunden mit der Synthese von Proteinen auf der Grundlage neusynthetisierter RNA-Species begonnen wird ⁶. Da aber die in der ersten Quellungsstunde beginnende Proteinsynthese während der nachfolgenden Embryoentwicklung erheblich intensiviert wird ⁷, muß postuliert werden, daß sowohl vorgebildete (gespeicherte) als auch neusynthetisierte mRNA essentiell für die Differenzierung im Weizenembryo ist, ähnlich wie es für die frühe embryonale Entwicklung des Seeigels gezeigt werden konnte ⁸.

Die Existenz einer stabilen mRNA-Fraktion im trockenen Weizenembryo ist inzwischen nicht nur gesichert ⁹; es liegen auch Informationen über Enzyme wie o-Diphenolase, Peroxidase, Ribonuclease vor, die auf ihrer Grundlage translatiert werden sollen ¹⁰. Weil sowohl im ruhenden als auch im keimenden Weizenembryo DNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivitäten nachweisbar sind ¹¹, ist die Transkription während der frühen Keimungsphase sehr wahrscheinlich. Uneinigkeit besteht allerdings hinsichtlich der Natur der zuerst synthetisierten RNA. Marcus et al. ¹² finden mRNA- und rRNA-Species, wobei die Synthese von mRNA in den ersten 6 Stunden der Keimung im Vordergrund steht und ein Anstieg der rRNA-Synthese zwischen 6 und 18 Stunden zu verzeichnen ist. Andererseits lehnt Buchowicz ^{14,15} auf Grund seiner Befunde eine rRNA-Synthese vor 12 Stunden nach Keimungsbeginn ab. Seinen Arbeiten stehen die von Osborne ¹³ gegenüber, der bereits nach einer Stunde neu-synthetisierte ribosomale Ribonucleoprotein-Komplexe neben einer Reihe anderer RNA-Species isoliert hat.

Die verfügbaren Daten lassen somit gegenwärtig eine völlige Klärung des Zeitverlaufes der auf makromolekularer Ebene faßbaren Veränderung im Weizenembryo noch nicht zu.

DNA-Replikation kann als das Schlüsselereignis im Zellzyklus jeder eukaryotischen Zelle betrachtet werden, weil sie die genetische Voraussetzung für eine erfolgreiche Zellteilung schafft. Für den Eintritt der Zelle in die S-Phase ist - wie für alle bis heute untersuchten Zelltypen feststeht - eine rasch einsetzende, kontinuierliche Proteinbiosynthese absolute Notwendigkeit. In der frühen Keimungsphase interessiert daher vor allem die Aktivitätsverteilung jener Gruppe von Proteinen, die an der Synthese von DNA beteiligt sind. Neben vielen anderen Enzymen des Nucleotidstoffwechsels kommen besonders DNA-Polymerasen und Ribonucleotidreduktasen als mögliche Kontrollsysteme bei der Keimung in Frage, weil sie gruppenspezifisch für Bildung und Kondensation aller vier Desoxyribonucleotide verantwortlich sind und in vitro zahlreiche Regulationsphänomene zeigen. Ihr Auftreten läßt eine ausgeprägte Korrelation mit dem Beginn der DNA-Replikation erwarten. Eine DNA-Polymerase aus keimenden Weizenembryonen wurde teilgereinigt¹⁶. Es wird angenommen, daß die de novo-Biosynthese des Enzyms in den ersten 6 Stunden der Keimung beginnt. In den nächsten 6 Stunden verdoppelt sich der Einbau radioaktiver Aminosäuren in die gereinigte Polymerase-Fraktion, um bis 18 Stunden kontinuierlich weiterzugehen.

Eine eigene frühere Arbeit¹⁷ beschreibt die Beobachtung der Ribonucleotidreduktase-Reaktion in Extrakten isolierter Embryonen bestimmter Weizensorten. Mit der weiteren Untersuchung dieser Enzymaktivität in vitro und in vivo befaßt sich die vorliegende Arbeit. Weiterhin wird die intrazelluläre Konzentration zweier aufphosphorylierter Produkte der Ribonucleotidreduktase (und eigentlichen DNA-Vorstufen, die Desoxyribonucleosidtriphosphate dATP und dTTP) bestimmt.

Da für Pflanzen allgemein - besonders aber für die höheren Pflanzen - vergleichbare Daten fehlen oder nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stehen (siehe 1.4), wird in den beiden folgenden Abschnitten die Bedeutung der genannten Themen an anderen, gut untersuchten Beispielen vorgestellt, und einige wichtige Ergebnisse aus diesen Systemen werden erläutert.

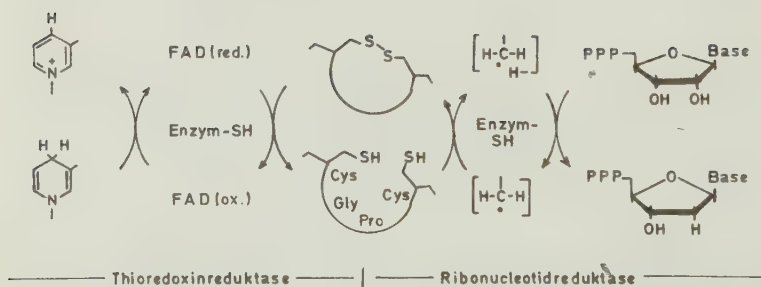


Abb. 3: Schema der Wasserstoffübertragung bei der Ribonucleotid-Reduktion

1.2 Ribonucleotidreduktasen

Entgegen der Biosynthese von Pyrimidin- und Purinribonucleotiden aus Ribose-5-phosphat gibt es keinen entsprechenden Weg zu Desoxyribonucleotiden unter Verwertung von 2-Desoxy-D-ribose¹⁸. Vielmehr zeigten frühe Isotopenexperimente¹⁹, daß die Desoxyriboverbindungen auf der Nucleotidstufe durch eine direkte Reduktion am 2'-C-Atom der Ribose gebildet werden. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, heißen Ribonucleotidreduktasen (EC 1.17.4). Sie reduzieren alle vier Ribonucleosid-5'-phosphate zu den entsprechenden Desoxyribonucleosid-5'-phosphaten, indem durch gewisse Dithiole die 2'-Hydroxylgruppe durch Wasserstoff ersetzt wird (Abb. 3). Man kennt heute zwei Arten von Ribonucleotidreduktasen, die in reiner Form isoliert und im Detail studiert werden konnten.

Das Enzym aus *E. coli*²⁰ (Typ I; EC 1.17.4.1) setzt Diphosphate um. Es ist ein Nicht-Häm-Eisen enthaltendes Protein, das ATP und Mg^{++} -Ionen als Cofaktoren benötigt. Eisenkomplexbildner wie Hydroxyharnstoff sind als wirksame Inhibitoren isolierter Ribonucleosiddiphosphatreduktasen beschrieben worden²¹. In vivo scheint Hydroxyharnstoff jedoch keinen generellen Einfluß auf die Bildung der vier Desoxyribonucleosidphosphate zu haben^{22,23}.

Enzyme vom Typ II, repräsentiert durch das *Lactobacillus leichmannii*-System²⁴ (EC 1.17.4.2), benutzen als Substrat die Ribonucleosidtriphosphate und als Cofaktor der Wasserstoffübertragung 5'-Desoxyadenosylcobalamin (Coenzym B_{12}).

Die heute vorliegenden Befunde lassen darauf schließen, daß der Coenzym B_{12} -abhängige Typ II vor allem unter Prokaryonten verbreitet ist, während Enzyme vom Typ I in eukaryotischen Zellen vorliegen. Ausnahmen von dieser Regel sind bekannt: zum einen besitzt unter vielen getesteten blaugrünen Bakterien mit Typ II *Agmenellum quadruplicatum*²⁵

ein Typ I-Enzym, zum anderen findet man in der eukaryotischen Alge *Euglena gracilis* ²⁶ die Typ II-Reduktase.

In ruhenden Zellen ist die Aktivität der Ribonucleotid-reduktase gering und kaum nachweisbar. Dagegen korreliert sie in rasch wachsenden Geweben deutlich mit deren mitotischem Index. Der Reaktionsmechanismus des eigentlichen Reduktionsprozesses beider Reduktase-Typen ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt, jedoch ist der Mechanismus ihrer Regulation in vitro detailliert untersucht worden. Demnach sind Ribonucleotidreduktasen durch Bindung von Desoxyribonucleosidtriphosphaten und ATP einer komplizierten allosterischen Regulation unterworfen. Untersuchungen von Brown & Reichard ²⁷ mit dem *E. coli*-Enzym zeigen vor allem einen bemerkenswerten Effekt von dATP. Hohe Konzentrationen dieses Nucleotids hemmen die Reduktion aller Nucleotide stark, während bei einer Konzentration unter $1 \mu\text{Mol}$ dATP eine Stimulation der CDP-Reduktion beobachtet wird. Beim *E. coli*-Enzym stimuliert dTTP die Bildung aller Desoxyribonucleotide. Vom Enzym aus Novikoff-Ascitestumorzellen der Ratte ²⁸ wird eine schwache Hemmung der CDP- und UDP-Reduktion durch dTTP berichtet.

Das ganze Gebiet umfassende Übersichtsartikel liegen von Follmann ²⁹ und Hogenkamp & Sando ³⁰ vor..

1.3 Desoxyribonucleosidtriphosphate in der intakten Zelle

Während der S-Phase braucht die Zelle eine ausgewogene und kontinuierliche Versorgung mit Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTP) (Abb. 4). Sieht man von der Tatsache ab, daß die Triphosphate als Vorstufen für die DNA-Replikation vereinzelt in Frage gestellt werden ³¹, kann man ein dynamisches Gleichgewicht zwischen ihrer Poolgröße in der Zelle und der DNA-Synthese erwarten. Die dNTP-Gehalte der Zelle liegen um 1-2 Größenordnungen unter denen der Ribonucleo-

Für das Studium der intrazellulären dNTP-Pools sprechen zwei Gründe: Die Verwendung von exogenen, radioaktiv-markierten DNA-Vorläufern, im besonderen [^3H]Thymin, ist weit verbreitet, um routinemäßig den Verlauf der DNA-Replikation zu bestimmen. Der Einbau von [^3H]Thymin unter verschiedenen Bedingungen kann aber nur dann ein brauchbarer Indikator für die relative DNA-Syntheserate sein, wenn sichergestellt ist, daß die endogenen dTTP-Gehalte in den untersuchten Fällen nicht sehr variieren und die spezifische Aktivität des resultierenden internen dTTP-Pools unter allen Umständen den gleichen Wert erreicht.

Der zweite Punkt betrifft die mögliche Funktion der dNTP bei der Regulation der DNA-Synthese. Speziell die aus Versuchen mit zellfreien Extrakten bekannte "feedback"-Kontrolle der dNTP auf die Ribonucleotidreduktase-Reaktion *in vitro* wird damit einer experimentellen Prüfung für die Situation der intakten Zelle zugänglich. In Übereinstimmung mit dem Einfluß von dNTP auf die Reduktion, wie er zuerst von Reichard et al.³⁴ und später von Moore & Hurlbert²⁸ beobachtet wurde, führt im allgemeinen die Zugabe eines Desoxyribonucleosids zum Inkubationsmedium zu starken Veränderungen der zellulären Gehalte anderer Desoxyribonucleosidtriphosphate. Berücksichtigt man die Verteilung der dNTP im Zellvolumen so reicht die Übereinstimmung zwischen den in vivo und in vitro erhaltenen Ergebnissen bis zu wirk-samen Konzentrationen^{35,36}, d. h. in der intakten Zelle wird im gleichen Umfang eine Änderung der einzelnen dNTP-Gehalte hervorgerufen, wie man sie im *in vitro*-Test auf Grund der hemmenden bzw. stimulierenden Effekte der dNTP auf die Reduktion beobachtet. Auch die Befunde von Reichard & Bjursell³⁷ sprechen für eine Beziehung der *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Daten. Sie fanden, daß das für die Synchronisierung von Gewebekulturen verwendete Thymin über einen hohen dTTP-Pool zu einem reduzierten dCTP-Gehalt führt, der dann den Stillstand der DNA-Synthese veranlaßt. Die Autoren weisen daraufhin, daß dTTP *in vitro* die Reduktion von CDP zu dCDP hemmt. Der Vermutung, daß die Größe

des dCTP-Pools eine regulatorische Funktion bei der DNA-Synthesegeschwindigkeit hat, wurde allerdings auch widersprochen ³⁸.

Messungen in verschiedenen Zellen zeigten stets eine große Fluktuation der dNTP-Gehalte während des Zellzyklus. G₁-Zellen enthalten im allgemeinen keine oder eine kaum nachweisbare Menge dieser DNA-Vorläufer. Beim Übergang zur S-Phase beginnen die Poolgrößen zu steigen und erreichen beispielsweise in kultivierten Hamsterzellen Werte zwischen 10 und 100 pMol pro 10⁶ Zellen ²². Wie Berechnungen zeigen, können diese dNTP-Mengen die DNA-Synthese nur etwa 1-5 Minuten unterhalten. Den größten Vorrat an DNA-Vorstufen, der gegenwärtig bekannt ist, enthält das unbefruchtete Seeigellei (13 - 130 pMol pro einzelne Eizelle!) ⁸⁵. Selbst die Hemmung der dNTP-Synthese bei der Befruchtung hatte für längere Zeit keinen Einfluß auf die riesige Poolgröße. Die geringe Abnahme der dNTP zwischen den S-Phasen scheint kein ausreichender Grund zu sein, die DNA-Synthese zu begrenzen. Diese Tatsache spricht, ebenso wie die weiter oben bereits angedeutete dafür, daß adäquate dNTP-Versorgung nur eine von vielen möglichen Bedingungen ist, die die Geschwindigkeit der DNA-Replikation kontrollieren ³⁸.

1.4 Ribonucleotidreduktasen und Desoxyribonucleosidtriphosphat-Bestimmungen in pflanzlichen Zellen

Wohl nicht zuletzt wegen der Möglichkeit zur Synchronisation sind schnell wachsende Einzeller und die teilungsaktiven Gewebe höherer Organismen bevorzugte Objekte der Molekularbiologie. Man kann sagen, daß bei höheren Pflanzen derzeit noch die Beschreibung vereinzelter Prozesse auf makromolekularer Ebene im Vordergrund steht. Nur wenige Untersuchungen beschäftigen sich hier mit dem Nachweis und der Biosynthese von Enzymen, die zum Auftreten dieser Makromoleküle - besonders der Desoxyribonucleinsäure - Anlaß geben.

Die folgende Aufzählung umfaßt zum Pflanzenreich gehörende Organismen, für die dennoch einige experimentelle Daten im Hinblick auf Ribonucleotidreduktase-Aktivität und dNTP-Gehalt verfügbar sind.

Als erste pflanzliche Ribonucleotidreduktase wurde die des Weizens ³⁹ nachgewiesen. Inzwischen liegen Befunde über dieses Enzym auch in anderen höheren Pflanzen vor: der Acker- oder Pferdebohne ⁴¹ (*Vicia faba*) und der Sojabohne ⁴¹ (*Glycine max*). Hinzu kommen Untersuchungen an niederen einzelligen Eukaryonten: der Hefe ⁴² (*Saccharomyces cerevisiae*), den Euglenophyceae ⁴³ (*Euglena* und *Astasia*), den Chlorophyceae ⁴⁴ (*Scenedesmus* und *Chlorella*) und an dem Pilz *Achlya* ⁹⁰.

Die Methode zur quantitativen Bestimmung der dNTP-Mengen in intakten Zellen ist noch sehr neu. Ab 1973 wird von Experimenten berichtet, die sich mit den Schwankungen des dNTP-Pools während des Zellzyklus in einer Kieselalge (*Cylindrotheca fusiformis*) ⁴⁵, einem Pilz (*Physarum polycephalum* ⁹¹), einem Protozoon (*Tetrahymena pyriformis* ⁴⁶) und in zwei Algen (*Euglena gracilis* ⁴⁷, *Chlamydomonas reinhardtii* ⁴⁸) befassen. Arbeiten, die über eine derartige Bestimmung in einer höheren Pflanze berichten, liegen zur Zeit nicht vor.

2. Experimenteller Teil

2.1 Pflanzenmaterial

Für die meisten Untersuchungen wurde unbehandelter Winterweizen der Sorten "Otus" und "Kormoran" aus dem von Lochow-Petkus Saatzuchtbetrieb (Stöckheim und Monsheim) verwendet; sie wurden von dort alljährlich bezogen. Die Lagerung erfolgte trocken bei Zimmertemperatur. Einige ältere Weizensorten (Winterweizen Jubilar 1967) wurden uns freundlicherweise von der Bayrischen Landesanstalt für Pflanzenbau (Freising) zur Verfügung gestellt. Sie wurden gemäß entsprechenden Angaben entweder bei +2° C oder bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

2.1.1 Vernalisation

Für die Vernalisation wurden Weizensamen (Otus) des letzten Erntejahrgangs verwendet, mit einer Na-hypochloritlösung (0,1 % aktives Chlor, 10 min) oberflächensterilisiert, mehrfach mit sterilem Wasser gewaschen und 14 Stunden bei 25° C unter Wasser angequollen. Nach dem Entfernen von anhaftendem Wasser mit Krepppapier wurden die ganzen Körner in große trocken-sterilisierte Petrischalen überführt, die mit Filterpapier ausgelegt waren. Die Vernalisation erfolgte für den angegebenen Zeitraum (0 - 64 Tage) bei +2° C im Dunkeln. Kontrollproben werden sofort nach der Wasseraufnahme verarbeitet.

2.1.2 Handisolierung von Weizenembryonen

Waren nur geringe Mengen Samen einer Sorte (Jubilar 1967) verfügbar oder bei Verwendung älterer Weizenkörner erwies es sich als notwendig bzw. vorteilhaft, die ganzen Karyopsen anzukeimen. In diesem Fall erfolgt die Keimung in großen mit feuchtem Vermiculit gefüllten Petrischalen, die im

allgemeinen 20 Stunden in einen Brutschrank (25° C) gestellt wurden.

Die Embryonen dieser Proben werden wie die der vernalisierten Karyopsen mit einer Präpariernadel von Hand isoliert.

2.1.3 Embryonenisolierung nach Johnston & Stern

Die Gewinnung von Embryonen aus ruhenden Karyopsen geschieht durch Flotieren zerkleinerter und gesiebter Körner nach Johnston & Stern ⁴⁹. Dazu werden in 200 g-Portionen gleiche Mengen Weizenkörner und Trockeneisstückchen 20 sec im Mixer zerkleinert. Das zerschlagene Material verteilt sich unter Schütteln auf 3 Siebe. Die Fraktion, die das Sieb mit der Maschenweite 0,63 mm nicht passieren kann, ist mit Embryonen angereichert. Die weitere Aufarbeitung dieser Fraktion erfolgt vorzugsweise durch Flotieren in einem Gemisch aus Cyclohexan-Tetrachlorkohlenstoff (10:25; v/v; $D = 1,36 \text{ g/cm}^3$). Die leichteren Embryonen kann man durch Abschöpfen gewinnen. Sie sind nach kurzer Zeit trocken und können entweder sofort ausgesät oder in einem geschlossenen Gefäß im Kühlschrank aufbewahrt werden. In einigen Fällen wurden die Embryonen auch mit einer 1,9-molaren Saccharose-Lösung ($D = 1,24 \text{ g/cm}^3$) von noch vorhandenen Endospermteilen getrennt. Nach dem Waschen mit einer physiologischen Kochsalzlösung mußten diese aber sofort verwendet werden.

Die Keimung erfolgt auf 0,9 %-igem Agar-Agar in kleinen Petrischalen. 250 mg Embryonen werden auf einer Platte verteilt, mit 1,5 ml Glucose-Lösung (2 % Glucose, 0,01 % Streptomycinsulfat) befeuchtet und im Dunkeln bei 25° C inkubiert.

2.1.4 Aufschluß des Pflanzenmaterials

Die handisolierten Embryonen bzw. die nach der Keimung auf Agar gewonnenen Embryonen, die durch mehrmaliges Waschen mit Wasser von noch vorhandenem Medium befreit wurden, werden in flüssigem Stickstoff gefroren. Aus praktischen Gründen werden die Zellen vorzugsweise im "Mikrodismembrator" (Braun Melsungen) durch schnelle Schwingungen von drei Stahlkugeln in einem Teflonegefäß zerschlagen. Für eine gute Zerkleinerung erwies sich eine Aufschlußzeit von 3×1 Minute mit zwischen-geschaltetem erneuten Einfrieren als sinnvoll. Je nach Untersuchungsziel wird das entstandene Mehl in verschiedenen Puffern bzw. Lösungen aufgenommen und wie in den folgenden Abschnitten beschrieben weiterverwendet.

2.2. Ribonucleotidreduktase-Test

2.2.1 Inkubation

Im Standardtest wird die Reduktion von radioaktivem Cytidinphosphat zu Desoxycytidinphosphat verfolgt, weil für die Cytidinnucleotide empfindliche Methoden zur Substrat-Produkt-Trennung beschrieben werden ⁵⁰.

Die zerkleinerten Embryonen werden in Phosphatpuffer aufgenommen:

0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,8

0,2 % (v/v) 2-Mercaptoäthanol

Der Überstand nach 20 min Zentrifugation bei 16 000 rpm (Sorvall-Kühlzentrifuge, SS 34-Rotor, etwa 30 000 g) stellt den Rohextrakt dar und wird in den Enzymtest eingesetzt.

Die Inkubationsmischung enthält in 0,3 ml Endvolumen:

10 μCi = 0,43 nMol $[5\text{-}^3\text{H}]\text{CDP}$

(spez. Akt.: 23 mCi/ μMol , Amersham-Buchler)

für Säulentrennungen (s. 2.2.3)

bzw.

6 μCi = 6 nMol [$5\text{-}^3\text{H}$]CDP

(spez. Akt.: 1 Ci/mMol, Amersham-Buchler)

für die papierchromatographische Trennung (s. 2.2.2).

10 mM DTT

3,5 mM ATP

0,03 mM Fe^{3+} als $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,03 mM Fe^{2+} als $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,2 ml Rohextrakt (4-5 mg Protein)

Die Inkubationszeit beträgt 1 Stunde bei 30°C . Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 ml 1 M HClO_4 und 1 μMol dCMP als Träger beendet. Die Monophosphate der Nucleotide erhält man durch Hydrolyse, die 10 min bei 100°C durchgeführt wird. Das gleichzeitig ausgefallene Protein wird abgetrennt und im Überstand mit 4 M KOH ein pH von etwa 6 eingestellt. Nach einer halben Stunde im Eisbad wird der KClO_4 -Niederschlag abzentrifugiert und die Lösung dann zur Trockene eingengt. Für die papierchromatographische Trennung wird der Rückstand in 100 μl Wasser aufgenommen, für die säulenchromatographische Analyse in 200 μl 0,2 N Essigsäure, die zusätzlich 1-2 μMol CMP für die UV-Registrierung enthält.

2.2.2 Papierchromatographische Analyse

Die routinemäßige Auftrennung von Substrat und Produkt erfolgt auf Papier (Schleicher & Schüll, 2043b Mgl) absteigend in einem Fließmittel nach Reichard⁵⁰:

$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 5 M, pH 9,5	20 ml
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ gesättigt	80 ml
Äthanol	220 ml
EDTA, 0,5 M	0,5 ml

Zur besseren Trennung wird die volle Länge des Papiers ausgenutzt; daraus resultiert eine Laufzeit (stark temperaturabhängig!) von mindestens 24 Stunden. Die Lokalisation des dCMP-Trägers erfolgt unter UV-Licht und durch Vergleich mit authentischen Proben. In manchen Fällen war eine Rechromatographie im gleichen Laufmittel nach Besprühen des dCMP-Bereiches mit 1 %-iger NaJO_4 -Lösung zur Zerstörung der Ribotide notwendig.

2.2.3 Säulenchromatographische Analyse

Für quantitative Messungen werden CMP und dCMP an einem Kationenaustauscher getrennt:

Harz: Dowex 50 WX 2, 200-400 mesh (Serva)
Säule: 25 x 0,9 cm
Elutionsmittel: 0,2 N CH_3COOH

Die Elution der Nucleotide erfolgt bei Zimmertemperatur. Bei einem Fraktionsvolumen von 1,5 ml/10 min und 170 - 180 Fraktionen dauert die Trennung der Nucleotide 30 Stunden. Unter diesen Bedingungen können die ungefähren Positionen von CMP und dCMP wie folgt angegeben werden:

CMP: Fraktion 85 bis 114
dCMP: Fraktion 134 bis 165

Nach der genauen Bestimmung von Anfang und Ende eines radioaktiven Peaks erfolgt durch Entnahme aliquoter Teile aus den betreffenden Fraktionen eine Summation über die CMP- und dCMP-Bereiche. Da die verwendeten Rohextrakte im Ribonucleotidreduktase-Test einen Substratabbau und zahlreiche Substratveränderungen bewirken, ist eine Substratsättigung unter diesen Bedingungen nicht erreichbar. Jedoch sind die bei Testserien gewonnenen Daten reproduzierbar und vergleichbar, wenn als Ausbeute der prozentuale Anteil von dCMP an der Summe (CMP + dCMP) bestimmt wird. Als Umsatz

gilt dann % gebildetes dCMP pro mg Protein und Stunde unter Standardbedingungen.

2.3 DNA-Markierung

2.3.1 Nucleosid-Einbau

250 mg Embryonen - nach Johnston & Stern isoliert - werden nach verschiedenen Zeiten von der Agar-Platte entfernt und zur Fortsetzung der Keimung in Gegenwart des Tracers in ein Becherglas überführt. Das Volumen des Keimmediums (2 %-ige Glucoselösung) wird so gewählt, daß die Embryonen halb bedeckt sind, und betrug in unserem Fall 1,1 ml. Es enthält für die Einbauversuche entweder

0,1 mCi [Methyl-³H]Thyminidin
(spez. Akt.: 5 Ci/mMol, Amersham-Buchler)

oder

0,1 mCi [5-³H]Cytidin
(spez. Akt.: 3 Ci/mMol, Amersham-Buchler)

Als Markierungsdauer sind unter diesen Bedingungen zwei Stunden bei 25° C am günstigsten. Danach wird die Lösung rasch abpipettiert. Man wäscht die Embryonen zur Entfernung von äußerlicher Radioaktivität dreimal mit je 5 ml Eiswasser und zerkleinert sie anschließend im "Dismembrator" (s. 2.1.4).

2.3.2 Extraktion und Reinigung der DNA

Das zerkleinerte Material wird in 10 ml Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7,5
50 mM Na-citrat

aufgenommen und unter Rühren auf 60° C erwärmt. Man entnimmt einen Teil für die Proteinbestimmung und fügt

dann 0,5 g SDS ($\rightarrow$ 5 %, w/v) hinzu. Die Extraktion wird für weitere 10 min bei 60° C fortgeführt. Anschließend zentrifugiert man das Ungelöste bei 12 000 rpm ab (Sorvall-Zentrifuge, SS 34-Rotor, 20 min). Der Überstand wird mit 20 ml absolutem Äthanol versetzt und nach 30 min der Niederschlag, die rohe DNA-Fraktion, 3 mal mit 70 %-igem Äthanol zentrifugierend gewaschen (Christ Tischzentrifuge). Die Weizen-DNA wird einer sorgfältigen Reinigungsprozedur unterworfen:

1. Umfällen:

Der DNA-Niederschlag wird im Kühlraum über Nacht in 10 ml 2 M NaCl unter Schütteln gelöst. Dann wird die DNA wieder mit 20 ml absolutem Äthanol gefällt und - wie oben beschrieben - mit 70 %-igem Äthanol gewaschen.

2. Ribonuclease A-Behandlung ⁵¹:

Zu diesem Zweck gibt man zu der über Nacht in 10 ml 0,15 M NaCl/0,015 M Na-citrat gelösten DNA 0,5 ml Pankreas-Ribonucleaselösung (Merck, 2 mg Enzym/ml 0,15 M NaCl; pH 5); diese wird zuvor durch 10-minütiges Erwärmen auf 80° C von eventuell vorhandener Desoxyribonuclease-Aktivität befreit. Die Mischung wird 30 min bei 37° C inkubiert.

3. Deproteinierung:

Nach der Erhöhung der Salzkonzentration mit festem NaCl auf 2 M erfolgt die Entfernung von Protein. Dies geschieht durch Ausschütteln der DNA-Lösung mit 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v/v). Aus der wäßrigen Phase wird die DNA erneut mit absolutem Alkohol gefällt, mit alkoholischer Lösung gewaschen und kurz im Exsikkator getrocknet, damit sie sich anschließend gut in drei ml 1 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 löst.

4. Hydroxylapatit-Chromatographie ⁸²:

Die DNA-Lösung wird über Hydroxylapatit (Serva) chromatographiert. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten von 1 mM bis 500 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 und wird bei 260 nm verfolgt. Die hochmolekulare DNA erscheint unter diesen Bedingungen bei einer Konzentration von 300 bis 400 mM. Die Fraktionen werden gesammelt und die Radioaktivität bestimmt. Die spezifische Markierung der DNA errechnet sich aus der gemessenen Radioaktivität pro OD₂₆₀-Einheit und mg Protein.

5. Methylalbumin/Kieselgur-Chromatographie ⁹²:

Eine zusätzliche Chromatographie der gereinigten Weizen-DNA über Methylalbumin/Kieselgur (Serva) wird nach bekannten Verfahren durchgeführt und unter 3.2.1 beschrieben.

2.3.3 Basen-Analyse

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in durch Cytidin markierter und wie oben gereinigter DNA wurde eine Probe in 88 % Ameisensäure 45 min bei 170° C im zugeschmolzenen Rohr hydrolysiert, und das Hydrolysat (Purin- und Pyrimidinbasen) auf Dowex 1 x 8, Cl⁻-Form (Serva) in einem Ammoniak-NH₄Cl-Puffer (0,2 M; pH 10,6) getrennt.

Reihenfolge der Elution ⁹⁴: Cytosin - Thymin - Guanin - Adenin

Die Radioaktivität der Elutionspeaks wurde bestimmt.

2.4 dATP- und dTTP-Bestimmungen

2.4.1 Extraktion der Nucleotide

Das zerkleinerte Pflanzenmaterial von 250 mg isolierten ungekeimten bzw. gekeimten Embryonen wird in 2 ml Wasser aufgenommen. Alle nachfolgenden Schritte führt man im Kühlraum aus. Die Suspension wird kurz (1 min) bei niedriger Umdrehungszahl (350 rpm) im Potter homogenisiert. Die Extraktion erfolgt mit 60 %-igem Methanol: 1 ml Suspension wird mit 1,5 ml CH_3OH versetzt und das Ganze erneut homogenisiert. Alle so erhaltenen Suspensionen müssen zur vollständigen Extraktion etwa 20 Stunden bei -20°C aufbewahrt werden. Dann entfernt man das methanolunlösliche Material durch Zentrifugation bei 13 000 rpm (Sorvall-Zentrifuge, SS 34-Rotor, 15 min). In den meisten Fällen wurde nur ein Teil des Überstandes (0,5 ml) entweder am Rotavapor (5-10 min, Badtemp. max. 30°C) zur Trockene eingedampft oder gefriergetrocknet (1/2-1 Stunde, 0°C). Der Rückstand sowie der Rest des Überstandes kommen zur Aufbewahrung bei -20°C . Kurz vor der dNTP-Bestimmung löst man die eingeeengten Extrakte in einem geeigneten Volumen Polymerase-Puffer (s. 2.4.2). Bei Verwendung frischer Weizenkörner aus dem letzten Erntejahr erwies es sich als notwendig, die pulverisierten Embryonen anstatt in Wasser in einer wäßrigen "Chelex"-Suspension aufzunehmen. Der polymere Komplexbildner "Chelex" (Bio-Rad, München) verhindert den besonders in einem Extrakt aus frischen Samen festgestellten metallkatalysierten Nucleotidabbau (s. u.). "Chelex" wurde nach einer Vorschrift von Willard⁵² mit NH_4OH , 0,1 N HCl und Wasser vorgewaschen. Ein Teil frei sedimentiertes "Chelex" (0,7 mg/ml feucht) wird mit Wasser auf das 5-fache Volumen aufgefüllt. In dieser Konzentration angewandt, vermag es ungefähr zehnmal mehr Äquivalente zu binden

als dem ermittelten Magnesium- und Eisengehalt der Embryonen (0,017 meq/ml Rohextrakt) entspricht. Ansonsten wird wie oben verfahren, jedoch unter Auslassung der Homogenisation. Um dennoch eine gute Durchmischung zu erreichen, wird die Methanol/"Chelex"-Suspension 1/4 Std. bei 0° C geschüttelt.

2.4.2 dNTP-Bestimmung

Die Bestimmung von dATP und dTTP wird nach der von Lindberg & Skoog ³² beschriebenen Methode unter Verwendung des synthetischen Polydesoxyribonucleotids Poly-(dA-dT) als Matrizie für die DNA-Polymerase-Reaktion durchgeführt. Soll dTTP bestimmt werden, so setzt man radioaktives dATP zur Polymerisation ein und umgekehrt; die Mengen der in säureunlösliches Produkt eingebauten Radioaktivität ist der in einem Extrakt vorhandenen Menge des unmarkierten, komplementären Nucleotids streng proportional.

Käufliche DNA-Polymerase aus E. coli (Boehringer Mannheim, Reinheitsgrad I) wird portionsweise mit einer Mischung aus Enzymverdünnungslösung/Glycerin (1:1, v/v) auf die gewünschte Konzentration verdünnt und bei -20° C aufbewahrt.

Enzymverdünnungslösung:

0,05 M Tris/HCl	] — pH 7,5
0,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	
10 mM 2-Mercaptoäthanol	
1 mg/ml Rinderserumalbumin	

Auf diese Weise konnten innerhalb eines Jahres wesentliche Aktivitätsverluste des Enzyms vermieden werden.

Für alle Polymerisationsversuche wird der folgende Puffer verwendet:

50 mM Tris/HCl	}	pH 8,2
5 mM MgCl ₂		
1 mM 2-Mercaptoäthanol		

Jeder Testansatz (100 µl) enthält 50 µl einer in Puffer vorgefertigten Mischung aus:

33 pMol dTTP (1 µCi ³H; spez. Akt.: 30 Ci/mMol;
Amersham-Buchler)
für die Bestimmung von dATP

bzw.

91 pMol dATP (1 µCi ³H; spez. Akt.: 11 Ci/mMol;
Amersham-Buchler)
für die Bestimmung von dTTP

1,5 nMol Poly-(dA-dT) (Boehringer)

0,1 U ⁵³ DNA-Polymerase aus E. coli (Boehringer)

und 10-50 µl der zu untersuchenden Extrakte.

Die Ansätze werden bei 37° C inkubiert. Nach einer Stunde beendet man die Reaktion durch Abkühlen im Eisbad. Man pipettiert 50 µl des Reaktionsgemisches auf Glasfaserfilter (Whatman, GF/A) und sammelt sie in einem Waschkörbchen nach Matthaei (Schleicher & Schüll). Die Filter werden anschließend in folgenden eiskalten Lösungen je 15 min gewaschen:

1. 10 % Trichloressigsäure - 1 % Na₄P₂O₇
2. 5 % Trichloressigsäure - 1 % Na₄P₂O₇
3. 5 % Trichloressigsäure - 1 % Na₄P₂O₇
4. Äthanol/Äther (3:1)
5. Äther

Nach dem Trocknen unter der IR-Lampe (5 min) sind die Proben fertig für die Radioaktivitätsmessung.

Bei jeder Testserie muß eine Standardkurve mit bekannten dNTP-Mengen aufgenommen werden. Als Kontrollprobe dient ein Ansatz mit Puffer. Unter Zugrundelegung der Eichwerte kann aus den gemessenen Radioaktivitäten der dNTP-Gehalt der Extrakte bestimmt werden. Die Eichung erfolgt in der Regel im Bereich zwischen 1-10 pMol dNTP pro Ansatz oder für nicht ankonzentrierte Methanolextrakte zwischen 0,2 und 2 pMol dNTP. Diese Eichung erwies sich als notwendig, um Störungen beim Test wie fehlende Proportionalität zwischen eingesetzter Extraktmenge und gemessener dNTP-Menge oder unvollständiges Wiederfinden zugesetzter dNTP-Mengen zum Extrakt zu erkennen (s. u.).

2.5 DNA-Bestimmung

2.5.1 Extraktion der DNA

Für die fluoreszenzspektroskopische DNA-Bestimmung (s. 2.5.2) muß die DNA zunächst aus der wäßrigen Suspension zerkleinerter Embryonen extrahiert werden. Die direkte Anwendung der Methode ohne zwischengeschaltete DNA-Isolierung, wie sie bei Zellsuspensionen^{54,55} beschrieben wird, ist bei dem hier vorliegenden Pflanzengewebe nicht möglich, da sie zu kleine Meßwerte lieferte. Erfolgreich war dagegen eine Extraktion in phosphatgepufferten Kochsalzlösung:

1 ml wäßriger Rohextrakt wird mit
4 ml Phosphat-Puffer (0,05 M; 1,25 M NaCl, pH 7)
versetzt und 20 Stunden bei 6° C geschüttelt. Nach der Zentrifugation bei 12 000 rpm (Sorvall-Zentrifuge, SS 34-Rotor, 20 min) befindet sich die DNA im Überstand. Dieser wird mit einem kochsalzfreien Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7) auf eine für die Fluoreszenzmessung geeignete Konzentration verdünnt (meist 1:10).

Nochmalige Extraktion des Rückstandes ergab eine kleine Menge zusätzlicher DNA. Jedoch zeigten Kontrollen, daß ein einmaliger Vorgang reichte, um mindestens 95 % der DNA zu extrahieren.

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopische DNA-Messungen

Die Bestimmung von Nucleinsäuren in pflanzlichem Material ist schwieriger als in tierischen Geweben, weil hohe Konzentrationen von Kohlenhydraten und anderen polymeren Substanzen in der Pflanzenzelle vorliegen, die den Meßvorgang mit den sonst gebräuchlichen Methoden stören. Die Entfernung dieser Substanzen ist umständlich, zeitraubend und oft unvollständig⁵⁶. Andererseits ist es für viele molekularbiologische Daten wünschenswert, sie auf DNA- statt (bzw. und) Proteinbasis zu beziehen.

Zur direkten Bestimmung der DNA-Menge in Weizenembryonen benutzten wir mit Erfolg eine kürzlich für Tumorzellen der Maus und menschliche Fibroblasten⁵⁴ beschriebene Methode, die sich die Bildung eines fluoreszierenden Komplexes von DNA mit dem Antibiotikum Mithramycin zu Nutze macht. Die Fluoreszenz des sofort entstehenden Interkalationskomplexes⁵⁷ ist der DNA-Konzentration proportional. Mithramycin wurde von der Firma Pfizer GmbH (Karlsruhe) als "Mitracin" (Mithramycin/Mannit, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 1:40; w/w) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Fluoreszenz wird bei 540 nm in einem Fluoreszenzspektrometer (Baird-Atomic) gemessen. Die Anregungswelllänge beträgt 440 nm. Eine 3 ml-Küvette (für Fluoreszenzmessungen) enthält:

2,85 ml verdünnte, phosphatgepufferte DNA-Lösung (s. 2.5.1)
0,15 ml Mithramycin-Stammlösung (8 mg "Mitracin" = 0,2 mg Mithramycin/ml 300 mM MgCl_2)

Die Eichkurve wurde mit Kalbsthymus-DNA erstellt. In einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 μg DNA/ml erhält man eine lineare Abhängigkeit. Die Meßwerte sind bis zu einer

Konzentration von 0,5 M NaCl von der Ionenstärke der Lösung unabhängig. Höhere Kochsalzkonzentrationen bewirkten eine Dissoziation des Komplexes und führten zu einer Erniedrigung des Meßwertes. Wenn die DNA-Lösung vor dem Test mit einer bekannten Menge Kalbsthymus-DNA gemischt wurde, entsprach der gemessene Wert innerhalb der Meßgenauigkeit dem errechneten. Die Mischungsexperimente zeigen, daß die verwendeten DNA-Lösungen keine die Komplexbildung oder den Meßvorgang störenden Faktoren enthielten.

2.6 Allgemeine Methoden

Der Magnesium- und Eisengehalt trockener Weizenembryonen wurde freundlicherweise in der Analytischen Abteilung des Fachbereiches mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie (nach $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ -Veraschung der Proben) ermittelt. Folgende Werte liegen vor:

0,125 mg Fe/g Trockengewicht

3,1 mg Mg/g Trockengewicht

Diese Metallgehalte liegen 2-4-fach höher als die in ganzen Weizenkörnern gefundenen⁹³.

2.6.1 Spektralphotometrische Bestimmungen

Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Lowry et al.⁵⁸ mit Serumalbumin als Standard. Für Extinktionsmessungen stand ein Zeiss-Spektralphotometer (PMQ III) zur Verfügung. UV-Spektren zur quantitativen Bestimmung reiner Nucleotide und Desoxyribonucleotide wurden mit einem Cary-15-Spektralphotometer aufgezeichnet. Desoxyribonucleinsäure aus Weizen wurde fluoreszenzspektroskopisch bestimmt (s. 2.5.2).

2.6.2 Radioaktivitätsmessung

Wäßrige Lösungen wurden mit 10 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt. Als solche dienten entweder eine fertige Mischung "Unisolve" (Zinsser) oder "Bray's Lösung":

60 g Naphthalin, 4 g PPO, 200 mg POPOP, 100 ml Methanol
20 ml Äthylenglykol, 880 ml Dioxan.

Die Radioaktivität der Proben wurde nach der Methode des externen Standardverhältnisses in einem Packard-Szintillationszähler (3380/540) bestimmt. Die Messung polynucleotidgebundener Radioaktivität auf den Filterscheibchen erfolgte relativ, d. h. ohne automatische Standardisierung in 3ml Toluolszintillator:

1 l Toluol p. a.

5 g PPO

0,5 g POPOP

Die Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtplatten wurde mit einem Berthold-Dünnschichtscanner aufgezeichnet, die papierchromatographische Trennung radioaktiver Substanzen mit einem Packard-Radiochromatogramm-Scanner (7201) verfolgt.

2.6.3 Chromatographische Trennmethoden für Nucleotide

Beim Ribonucleotidreduktase-Test erfolgte die Trennung von Substrat und Produkt papier- bzw. säulenchromatographisch nach Reichard⁵⁰. Sie wird ausführlich in 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben. Zur Reinheitskontrolle der verwendeten radioaktiven Desoxyribonucleosidtriphosphate und zur Beantwortung der Frage, ob und in welchem Ausmaß sie in Extrakten einem unspezifischen Abbau zu den entsprechenden Di- und Monophosphaten unterliegen, wurden papierchromatographische Tests durchgeführt. Die Trennung der Desoxyribonucleotide erfolgte absteigend auf Schleicher & Schüll-Papier (2043b Mgl) im Fließmittel⁵⁹:

Isobuttersäure/ NH_3 conc/ H_2O 66 : 1 : 33

Alternativ kann bei Verwendung von [^3H]dTTP die Trennung der Phosphate auf Dünnschicht-Platten (PEI-Cellulose, Schleicher & Schüll) innerhalb kurzer Zeit vorgenommen werden ⁶⁰. Die Platten werden für die angegebenen Zeiten in folgende Lösungen gestellt:

1. 2 min 0,2 M LiCl
2. 6 min 1,0 M LiCl
3. 22 min 1,6 M LiCl

Die Desoxythymidin-5'-phosphate hatten die R_f -Werte:

dTTP = 0,16

dTDP = 0,28

dTMP = 0,45

2.6.4 Bestimmung von ATP mit Luciferin/Luciferase

Nach der Extraktion mit 0,25 M HClO_4 wurde ATP aus zerkleinerten trockenen bzw. gekeimten Embryonen nach der Methode von Kimmich et al. ⁶¹ bestimmt, die ein mit festem $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ aktiviertes Luciferin-Luciferase-System (Sigma-Chemie, München) benutzt. Die Messung der Lumineszenz der Proben erfolgte in einem Szintillationszähler (Packard, "β-Mate") unter manueller Probeneingabe 20 sec nach Zupipettieren der Testlösung. Die Eichung wurde mit ATP-Lösungen bekannten Gehaltes vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Weizenextrakten

In Vorarbeiten zu den hier beschriebenen Untersuchungen gelang erstmals der Nachweis einer pflanzlichen Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Embryonen keimender Weizenkörner 17, 39. Es wurde die Bildung von Desoxycytidin und -adenosinphosphat aus radioaktivem CDP bzw. ADP in Rohextrakten gezeigt. Neben diesem Befund stand die eigenartige Beobachtung, daß nur in gealterten, 2-3 Jahre gelagerten Weizensamen Ribonucleotidreduktion reproduzierbar zu finden war. Eine Charakterisierung der Enzymaktivität in vitro sowie eine nähere Analyse der Altersabhängigkeit waren die nächstliegenden weiteren Ziele; sie werden im folgenden beschrieben. Wegen der stets geringen Aktivitäten wurden die Versuchsbedingungen überall in vielfacher Weise variiert, um möglicherweise höhere Umsätze der Enzymreaktion zu erzielen.

3.1.1 Ribonucleotidreduktase aus Embryonen alter Weizensamen

Unter Verzicht auf eine Enzymreinigung, deren Schwierigkeiten später besprochen werden, habe ich zunächst optimale Testbedingungen bzw. das Substrat- und Cofaktorbedürfnis für die enzymatische Reduktion von [^3H]CDP durch Weizenextrakte studiert. Zum Nachweis der Produktbildung diente hier die papierchromatographische Trennung der radioaktiven Komponenten eines Inkubationsgemisches im borat-haltigen Fließmittel nach Reichard (Abb. 5). Gegenüber der methodisch aufwendigeren Säulentrennung und aus Gründen der Zeitersparnis fand diese Analysenmethode bevorzugt Anwendung, obwohl sie bestenfalls halbquantitative Aussagen zuläßt. Der Produktnachweis als dCMP ließ sich aber auch ionenaustauschchromatographisch bestätigen (vgl. 3.1.3). Das radioaktive Produkt ist im

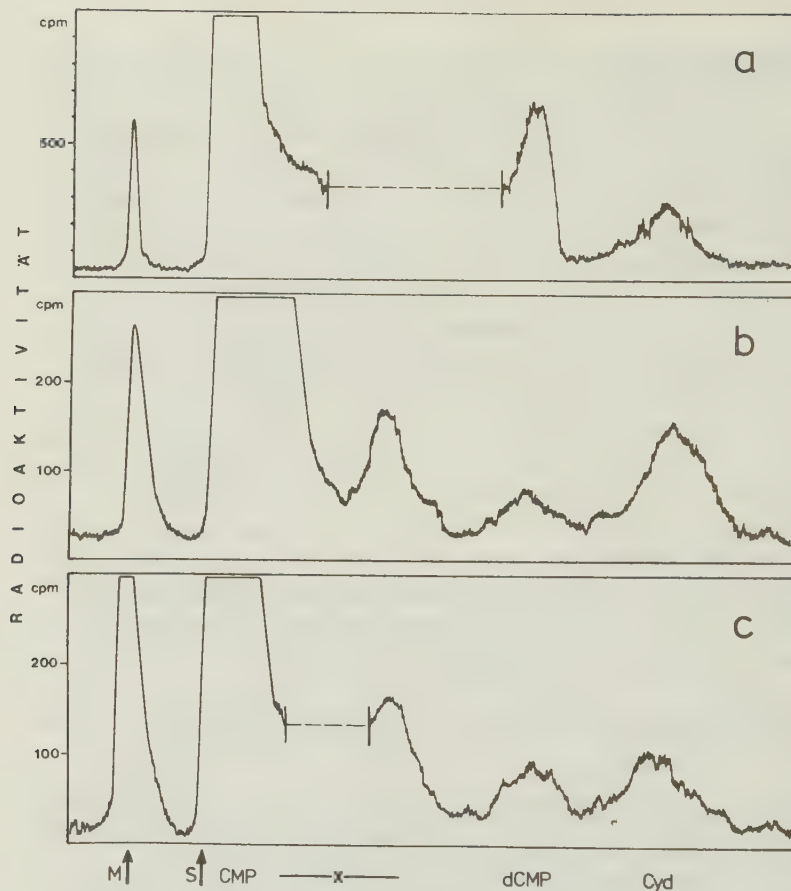


Abb. 5

Radioaktivitätsverteilung der Reaktionsprodukte verschiedener Ribonucleotidreduktase-Tests in der ersten Hälfte des Papierchromatogramms, M = Marker, S = Start

- a) Jubilar 1970 (Test 1974) handisolierte Embryonen, Keimzeit: 20 Std.
- b) Otus 1972 (Test 1975) isolierte Embryonen, 20 Std. in Gegenwart von 2,4 D gekeimt
- c) Kormoran 1971 (Test 1974) handisolierte Embryonen nach 20 Std. Keimung

Man sieht, daß die relativen Positionen der Produkte erhalten bleiben; die unterschiedliche Trennung von CMP und X (s. 3.1.4) ist angedeutet (---).

Gegensatz zum Substrat stabil gegen Natriumperjodat. Als Umsatz wurden 0,2 % d. h. unter den Testbedingungen 2 pMol CDP-Reduktion pro mg Protein und Stunde erreicht. Der Umsatz war innerhalb der erreichbaren Genauigkeit zwischen 15 und 60 min annähernd linear.

In Tab. 1 sind die mit zentrifugiertem Rohextrakt als Enzymquelle gefundenen Abhängigkeiten zusammengestellt. Das Enzym ist im in vitro-Test streng von der Anwesenheit eines Dithiols wie Dithiothreitol, Dithioerythrit oder reduzierter Liponsäure abhängig. Die Dithiole konnten nicht, wie von anderen Systemen bekannt ist, durch reduziertes E. coli-Thioredoxin ersetzt werden. Diese Tatsache schließt unserer Meinung nach aus, daß die geringe beobachtete Reduktion lediglich auf eine bakterielle Kontamination des verwendeten Pflanzenmaterials zurückzuführen ist. Ein Zusatz von Eisensalzen ($1 \mu\text{g Fe} = 0,06 \text{ mM}$) stimulierte die Enzymaktivität leicht, jedoch liegt - wie wir heute auf Grund des hohen endogenen Eisengehaltes der Weizenembryonen wissen (s. 2.6.) - bei Verwendung von Rohextrakt im Test schon eine etwa 10-fach höhere Eisenkonzentration vor. Von Hydroxyharnstoff weiß man, daß er in vitro eisenabhängige Ribonucleotidreduktasen hemmt. Hydroxyharnstoff (5-10 mM) und EDTA (5-10 mM) hatten aber nur einen geringen Aktivitätsverlust zur Folge. Wenn man das Enzym aus Weizen zu den eisenhaltigen Proteinen zählt, muß man daher annehmen, daß dieses Metall fest gebunden vorliegt. Coenzym B_{12} und Magnesiumionen hatten keinen Einfluß auf die Reaktion. Substrat- und Cofaktorbedürfnis der Ribonucleotidreduktase aus Weizen weisen, wie es für alle bis heute untersuchten Reduktasen aus eukaryotischen Geweben gilt, auf eine Zugehörigkeit des Enzyms zum Typ I (E. coli, s. 1.2) hin.

Tabelle 1 Bildung von [^3H]dCMP in Abhängigkeit verschiedener Komponenten der Inkubationsmischung unter Standardbedingungen. Die Werte wurden durch Abschätzung der Höhe des dCMP-Peaks (vgl. Abb. 5) erhalten.

Ribonukleotidreduktasetest	dCMP (%)
Standard([^3H]CDP, DTT, ATP, Fe, Puffer mit Mercaptoäthanol)	100
Standard-[^3H]CDP, +[^3H]CTP (4 μCi)	100
<u>Reduktionsmittel:</u>	
Standard -DTT	20
-DTT, -Mercaptoäthanol	0
-DTT, +DTE (10 mM)	100
-DTT, +reduzierte Liponsäure (10 mM)	120
-DTT, +Thioredoxin (0,1 mM)	
Thioredoxinreduktase (30 μg)	
NADPH (0,5 mM)	10
+Thioredoxin (0,02 mM)	100
<u>Cofaktoren:</u>	
Standard -Fe	70
-Fe, +EDTA (5-10 mM)	50
-Fe, +Hydroxyharnstoff (5-10 mM)	70
+Mg (5 mM)	100
+Coenzym B ₁₂ (10 μM)	100
<u>Nucleotide:</u>	
Standard -ATP	50
-ATP, +UTP (3,5 mM)	100
-ATP, +GTP (3,5 mM)	50
-ATP, +dATP (3,5 mM)	50

Wie von einem für die Proliferation wichtigen Enzym erwartet werden konnte, ist Ribonucleotidreduktase in Embryonen ungekeimter Samen nicht nachzuweisen. Dagegen tritt es zwischen 15 und 20 Stunden nach Beginn der Keimung auf. Alle folgenden Versuche unter veränderten Bedingungen konzentrieren sich auf eine Keimzeit von 18 bis 20 Stunden, da es technisch unmöglich war, stets die Keimzeitabhängigkeit aller variierten Größen zu überprüfen. Der gewählte Zeitpunkt ist jedoch für Ribonucleotidreduktion in vivo und DNA-Synthese der Embryonen optimal (vgl. 3.2) und kann daher auch für gegenüber den Standardbedingungen veränderten in vitro-Tests nicht völlig falsch sein.

Meine Bemühungen um eine wünschenswerte Enzymanreicherung und/oder Steigerung der Ausgangsaktivität mußten zum einen eine Abkehr von der nur für kleine Mengen Material anwendbaren Handpräparation von Embryonen anstreben, zum anderen die Keimungs-, Aufschluß- und Testbedingungen zu optimieren suchen.

Als großes Hindernis für eine kontinuierliche Arbeit mit Weizen eines bestimmten Erntejahres erwies sich die Tatsache, daß ältere Samen plötzlich innerhalb kurzer Zeit eine starke Verminderung der Keimfähigkeit erleiden konnten. Verminderte Lebensfähigkeit und späterer Keimfähigkeitsverlust wird auch von einer Reihe anderer Samen ⁶³⁻⁶⁶ bei trockener Lagerung berichtet. Für eine Erklärung des Mechanismus dieses Vorgangs auf biochemischer Basis liegt gegenwärtig zu wenig Information vor. Es werden Angaben über eine Schädigung embryonalen Gewebes ⁶⁷ gemacht, der Abbau von Makromolekülen ⁶³ diskutiert bzw. über eine Modifikation des Translationsapparates ⁶⁸ berichtet. Die Induktion und das zeitliche Auftreten von Ribonucleotidreduktase als Schlüsselenzym der DNA-Synthese und des Zellzyklus sollten von all diesen Faktoren stark abhängig sein.

Isolierung und Keimung von Embryonen

Eine geringe Menge Ausgangsmaterial, bedingt durch Handisolierung der Embryonen aus gekeimten Weizenkörnern, könnte durch eine Massenisolierung der Embryonen aus trockenen Samen nach der Methode von Johnston & Stern⁴⁹ umgangen werden. Die sich anschließende Keimung der so isolierten Embryonen auf Agar-Platten mit Glucose zeigte jedoch, daß diese Methode bei Verwendung älterer Samen keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte. Im Gegensatz zu den aus frischen Weizenkörnern gewonnenen Embryonen war nach 20 Stunden Keimung ein Wachstum kaum sichtbar. Dabei war es unerheblich, ob die Embryonen durch Flotation mit einer Rohrzuckerlösung oder mit dem organischen Lösungsmittelgemisch von Endospermteilen getrennt worden waren. Auch eine Versorgung der Embryonen mit einem Mineralmedium⁶⁹ hatte keinen sichtbaren Erfolg auf das Wachstum und keine Auswirkungen auf den Ribonucleotidreduktase-Test. Mit Extrakten aus vorisolierten Weizenembryonen nach 20 Stunden Keimung gelang der Nachweis des Enzyms, wenn 2,4 D (2,4 Dichlorphenoxyessigsäure, 0,01 %, w/v) mit dem Nährmedium zugegeben wurde. Dieses Resultat konnte bei Embryonen aus einer neuen Ernte nicht erzielt werden. Sen⁷⁰ berichtet von einem massiven [³H]Thymidin-Einbau in die meristematischen Zellen von *Vicia faba* in Gegenwart von 0,01 % 2,4 D (24 Stunden) im Vergleich zu parallel durchgeführten Kontrollexperimenten. 2,4 D könnte daher nicht nur eine Stimulierung der DNA-Synthese bewirkt haben, sondern auch eine Reprimierung gewisser Gene, die, wie Bayliss⁷¹ mutmaßt, für eine Verzögerung des Differenzierungsprozesses verantwortlich sind.

Die Versuche mit vorisolierten Embryonen älterer Weizen-samen waren jedoch im allgemeinen schlecht reproduzierbar. Grund dafür könnte einerseits die gegenüber den Embryonen aus frischen Körnern verminderte und von Isolierung zu Isolierung stark unterschiedliche Qualität der Embryonen

sein, aber auch der drastische Eingriff in die stoffwechsel-physiologische Situation durch Entfernung des Endosperms und der Aleuronschicht, die zu beachtlichen Restriktionen der biosynthetischen Kapazität führen könnten. Bei einem Vergleich der Resultate verschiedener Autoren wird zur Zeit dem verwendeten Ausgangsmaterial - vorisolierte Embryonen bzw. Keimung ganzer Karyopsen und anschließende Embryoisolierung - kaum Bedeutung zugemessen, jedoch ist diese variable Ausgangssituation bei der Arbeit mit Weizen als Erklärungsmöglichkeit unterschiedlicher Ergebnisse bei Untersuchungen der RNA-Synthese⁷² und redundanten Nucleotid-Sequenzen von Weizen-DNA⁷³ herangezogen worden.

Alle folgenden Versuche wurden wieder mit aus gekeimten Samen isolierten Embryonen durchgeführt.

Man weiß, daß Phytohormone - besonders Gibberelline - einen entscheidenden Einfluß auf das Wachstum haben. Bei Anwesenheit der Restkaryopse stimuliert GA_3 die Proteinsynthese unter Verwendung der im Weizenembryo gespeicherten mRNA. Augsten⁷⁴ zeigte, daß der Proteingehalt und die Phosphataseaktivität in den ersten 24 Stunden durch GA_3 -Behandlung erheblich zunehmen. Ein Einfluß auf die Translation anderer Enzyme - etwa der Ribonucleotid-reduktase - war nicht auszuschließen. Weizenkörner wurden in Gegenwart von GA_3 (3×10^{-6} M) unter Standardbedingungen gekeimt. GA_3 stimulierte unter diesen Bedingungen die Enzymaktivität im Reduktase-Test nicht und wurde für die folgenden Experimente nicht weiterverwendet.

Aufschluß des Pflanzenmaterials

Die Embryonen wurden entweder in einem vorgekühlten Porzellanmörser unter Zugabe von Puffer zerkleinert oder gefroren im Dismembrator. Aus rein praktischen Erwägungen wurde die letztgenannte Methode bevorzugt, da in diesem

Fall während der Aufarbeitung keine Kühlprobleme auftreten. Die Aufschlußmethode hatte keinen Einfluß auf den Proteingehalt des Zellhomogenats und auf das Ergebnis des Enzymtests.

Puffersysteme

Die zerkleinerten Embryonen wurden routinemäßig in einem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 aufgenommen, der 28 mM Mercaptoäthanol enthielt. Hohe Phosphatkonzentrationen (0,2 M) hemmen die Ribonucleotidreduktase aus Hefe zu 80 % ⁶². Eine Herabsetzung der Molarität auf 0,05 M war bei dem sauren Pflanzenextrakt jedoch nicht ohne weiteres möglich. Hatte der Rohextrakt vor dem Test noch einen pH um 7, so lag dieser nach der Inkubation oft unter 6,5. Von allen bis jetzt bekannten Säugetier-Reduktasen ist bekannt, daß sie ein pH-Optimum zwischen 6,5 und 7 besitzen. Ein konstanter pH von etwa 7 bei geringerer Ionenstärke konnte durch die Verwendung von 0,05 M Tris/HCl pH 7,6 und mit 0,05 M Tricin- oder Hepes-Puffer nach Good, pH 7,6 erreicht werden. Die Ergebnisse beim Reduktase-Test zeigten, daß der geringe Substratumsatz nicht auf die Gegenwart eines bestimmten Ions oder auf die Ionenstärke des Puffers zurückzuführen ist. Ein Zusatz von 28 mM Mercaptoäthanol wirkte sich auf die Stabilität des Enzyms im Rohextrakt günstig aus. Es war jedoch nicht auszuschließen, daß diese Substanz in der verwendeten hohen Konzentration den Testverlauf stört. Daher wurde die Mercaptoäthanolkonzentration im Puffer auf 10 mM herabgesetzt und später auch probeweise durch 2 mM DTT ersetzt. Ein Unterschied zu den Standardbedingungen konnte nicht festgestellt werden.

Dialyse

Die Ribonucleotidreduktase-Aktivität von Rohextrakten ⁴¹ und die Enzymstabilität ⁷⁵ werden oft durch eine Dialyse erhöht. Rohextrakte aus Weizenembryonen wurden zwischen

4 und 20 Stunden bei 0° C dialysiert. Danach war ein Enzymnachweis nicht mehr möglich. Der Grund hierfür ist vermutlich wie im Fall der Ribonucleotidreduktase aus Hefe ⁶², wo ebenfalls eine Dialyse nicht durchführbar war, in der Instabilität des ungereinigten Enzyms zu suchen. Versuche, den Rohextrakt von eventuell störenden niedermolekularen Substanzen zu befreien, wurden auch durch Ultrafiltration in Minicon-A25-Einheiten (Fa. Amicon) durchgeführt. Hier konnte Enzymaktivität in der erwarteten Größe beobachtet werden, doch eine Umsatzsteigerung ließ sich nicht feststellen. Minicon-A25-Zellen bewiesen ihre Brauchbarkeit auch zur Konzentrierung des Rohextrakts. Die einsetzbare Menge (< 1 ml) stellte jedoch den begrenzenden Faktor dar.

Testbedingungen

Fluorid hemmt Phosphatasen und macht einen Ribonucleotid-reduktase-Nachweis mit Rohextrakt aus Hefe ⁶² erst möglich. Beim Test mit ungereinigten Extrakten aus Novikoff-Tumorzellen der Ratte und Rattenembryonen ⁷⁵ verhindert F⁻ den Abbau von als Effektor zugesetztem ATP. NaF (6,6 mM) brachte die Aktivität des Weizenenzym zum Verschwinden, hatte aber keinen sichtbaren Einfluß auf den für Pflanzenextrakte typischen Substratabbau durch saure Phosphatasen, wie die papierchromatographische Überprüfung zeigte. Substratsättigung im Test ist bei Einsatz von Rohextrakten nicht erreichbar. Konzentrationserhöhung des radioaktiven Substrats ist sowohl aus Kostengründen als auch auf Grund der Testanalyse nur begrenzt möglich. Die eingesetzte Menge [³H]CDP betrug im Standardtest 6 nMol; sie wurde probeweise durch Zusatz von unmarkiertem CDP auf das 5- bis 10-fache erhöht. Die Verdünnung des radioaktiven Substrats führte dazu, daß bei papierchromatographischer Testanalyse eine Produktbildung nicht mehr eindeutig nachzuweisen war.

3.1.2 Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Extrakten aus Embryonen frischer Weizensamen

Keine der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Methoden machte es möglich, auch in Extrakten frisch geernteter bzw. ein Jahr alter Weizensamen Ribonucleotidreduktion nachzuweisen. Wie bereits erörtert, stehen durch Massenisolierung aus frischen Weizenkörnern qualitativ gute, auf Agar zu > 75 % keimfähige Embryonen in Gramm-Mengen zur Verfügung. Aufarbeitung und Ribonucleotidreduktase-Test zu verschiedenen Keimzeiten mit nur 2-stündigen Intervallen schloß aus, daß der Unterschied zu den Ergebnissen mit älteren Samen und die fehlende Reduktion ausschließlich auf eine zeitliche Verschiebung der Enzyminduktion oder auf einen kurzen Wirkungszeitraum bzw. raschen "turnover" der Reduktase zurückzuführen ist.

Von Untersuchungen mit der Ribonucleotidreduktase aus Hefe ist bekannt, daß der Rohextrakt eine nicht identifizierte, endogene Verbindung enthält, die einen Enzymnachweis verhindert⁶². Da es nicht ausgeschlossen war, daß eine ähnliche Situation in Extrakten aus Weizenembryonen frischer Samen vorliegt, schlossen die folgenden Experimente erste Reinigungsschritte ein. Die Versuche mit handisolierten Embryonen beschränkten sich auf eine Keimzeit von 18 Stunden. Für die Gelchromatographie an Sephadex G-25 wurde entweder der zentrifugierte Rohextrakt direkt oder der aufgelöste Niederschlag einer 50 %-igen Ammoniumsulfat-Fällung verwendet. Die Proteine wurden mit Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,5; 1 mM DTT) eluiert und in 2 ml-Fractionen aufgefangen. Die Fractionen des Ausschlußpeaks wurden in Minicon-Einheiten konzentriert und in den Standardtest eingesetzt. Die Auswertung ließ auch in diesen Fällen keine eindeutigen Aussagen über eine Produktbildung zu. Allerdings war allgemein die papierchromatographische Testanalyse bei Verwendung von Extrakten aus frischen Weizensamen schwieriger, weil durch

Konkurrenzreaktionen das Substrat in größerem Umfang verändert wurde. Als Störfaktor machte sich besonders die durch hohe Phosphatase-Aktivität bedingte Cytidinbildung bemerkbar, die den Nachweis geringer Produktmengen verhindert (Abb. 5). Bei der säulenchromatographischen Trennmethode wird Cytidin unter den verwendeten Bedingungen mit 0,2 N Essigsäure nicht eluiert. Daher kam bei den Versuchen mit vernalisiertem Weizen fast ausschließlich die Ionenaustauschchromatographie zur Anwendung.

3.1.3 Vernalisation und Ribonucleotidreduktase-Aktivität

Mehrere Aspekte der Kältebehandlung von Samen wurden in den vergangenen Jahren untersucht und zuletzt von Evans⁷⁶ zusammenhängend dargestellt. Demnach werden im Verlauf der Vernalisation mehrere Prozesse in komplexer Weise beeinflusst; unter anderem findet man eine Stimulierung meristematischen Gewebes, eine erhöhte Produktion von Phytohormonen und eine Aktivierung der DNA-Synthese.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Vernalisation von Winterweizen und den dadurch hervorgerufenen Veränderungen metabolischer Charakteristika gegenüber normal gekeimten Embryonen. Nach Devey⁷⁷ nimmt die Fähigkeit der Weizenembryonen zur Zellteilung unterhalb 5° C deutlich ab. Alle Befunde weisen daraufhin, daß während einer bei 2° C durchgeführten Vernalisationsperiode keine Zellteilung mehr stattfindet, wohl aber ist eine drastische Zunahme des DNA-Gehalts und der Kerngröße feststellbar⁷⁸. Teraoka⁶⁹, der die löslichen Proteine von vernalisierten Weizenembryonen untersuchte, fand bemerkenswerte Unterschiede zu normal gekeimten Embryonen. Eine Vernalisationsdauer von 60 Tagen hatte nicht nur eine Veränderung des bestehenden Proteinmusters zur Folge; es waren auch neue Proteine induziert worden.

Derartige drastische Änderungen der stoffwechselphysiologischen Situation während einer Kältebehandlung könnte auch auf die Induktion und Regulation des Enzyms Ribonucleotidreduktase einen Einfluß haben. Besonders interessant war es, die Keimstimulierung bei frisch geernteten Weizensamen zu untersuchen.

Die Vernalisation bei 2° C wurde mit ganzen Karyopsen durchgeführt. Die Isolierung der Embryonen erfolgte anschließend zu den angegebenen Zeiten (Tab. 2). Nach einer 14-stündigen Quellungsperiode bei 25° C ist bei Kontrollproben keine Enzymaktivität vorhanden. Dagegen zeigte nach einer Kältebehandlung zwischen 15 und 45 Tagen die säulenchromatographische Testanalyse, daß bei der Inkubation der Extrakte mit CDP Reduktion stattgefunden hat. Zur Zeit der Untersuchungen waren Experimente von Teraoka ⁷⁸ bekannt, die darlegten, daß Embryonen nach 60 Tagen Wachstum bei 2° C in Frischgewicht und Länge der Kotyledonen etwa 2 Tage alten, bei 26° C gekeimten Kontrollembryonen entsprachen. Während der DNA-Gehalt zwischen 0 und 15 Tagen Vernalisation keinen Unterschied aufwies, erfolgte eine Verdoppelung der DNA-Menge im Vergleich zu 2 Tage alten Kontrollembryonen zwischen 15 und 60 Tagen. Dies war der Grund, warum Proben zunächst nach einer 15-tägigen Kältebehandlung aufgearbeitet wurden und der Beginn des Auftretens von Ribonucleotidreduktase-Aktivität zwischen 0 und 15 Tagen nicht näher eingegrenzt werden konnte.

Der Substratumsatz liegt in diesen Extrakten etwa eine Größenordnung (Tab. 2) unter dem bei älteren Weizenembryonen gemessenen (0,2 %). Beide Werte sind jedoch nur bedingt vergleichbar, da die Radioaktivitätsverteilung nach Vernalisation - wie das Elutionsdiagramm der Nucleotide zeigt (Abb. 6) - ein von den anderen Testserien nicht bekanntes komplexes Muster aufweist.

Vernalisation (Tage)	mg Protein Test	CMP x 10 ⁶ [dpm]	dCMP [dpm]	dCMP (%)	dCMP -Nullwert (%)	% dCMP mg Protein	
-	- (Nullwert)	9,631	8 758	0,09	-	-	
0	4,9	5,790	4 932	0,08	0	0	
15	5,0	6,017	20 626	0,34	0,25	0,05	
21	5,1	5,394	11 823	0,22	0,13	0,025	
28	6,7	4,622	10 131	0,22	0,13	0,019	
45	4,2	5,805	9 312	0,16	0,07	0,017	
64	6,3	papierchromatographisch nicht nachweisbar					0

Tab. 2: Reduktion von [³H]CDP durch Rohextrakte aus vernalisiertem Weizen (Kormoran 1974). Die Werte wurden aus zwei unabhängigen Testansätzen ermittelt.

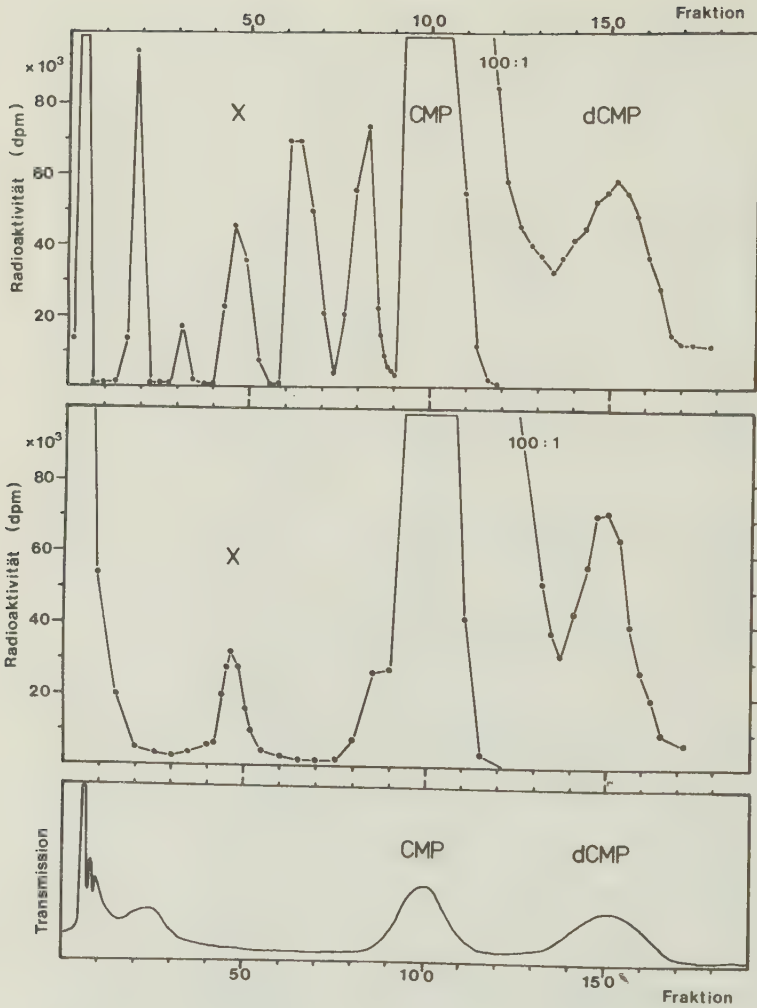


Abb. 6

Radioaktivitätsverteilung eines Enzymtests mit Extrakt aus vernalisiertem Weizen im Vergleich zu einer Probe aus nicht kältebehandelten, nach 20 Std. Keimung isolierten Embryonen älterer Samen. Elution der Nucleotide mit 0,2 N Essigsäure ((100:1) bedeutet 100-fache Vergrößerung).

Man erkennt, daß das Substrat [^3H]CDP in mannigfacher Weise verändert worden ist und die Bildung von Nebenprodukten mengenmäßig die Reduktion weit übertrifft. Eine Zuordnung der einzelnen Fraktionen wäre schwierig und nur mit zahlreichen Vergleichssubstanzen durchführbar gewesen und unterblieb. Sie war auch innerhalb der Aufgabenstellung nicht notwendig, da diese Nebenprodukte nicht im gleichen Bereich chromatographierten wie das Reduktionsprodukt und daher die Analytik nicht beeinträchtigten.

Die Versuche zur Ribonucleotidreduktase aus Weizen können folgendermaßen zusammengefaßt werden: Nach 20 Stunden Keimung wird Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Extrakten von Weizenembryonen gefunden. Für den Enzymnachweis ist es notwendig, daß die Embryonen von Hand isoliert wurden und daß sie von Weizensamen stammten, die bei voller Keimfähigkeit mindestens 3 Jahre alt waren. Eine Optimierung des Substratumsatzes kann mit den beschriebenen Methoden nicht erreicht werden. Dagegen ist ein brauchbarer Ansatz für eine Aktivitätssteigerung bzw. Anreicherung der Weizen-Ribonucleotidreduktase erkennbar, wenn nach Charakterisierung eines offenbar in den Weizenextrakten vorhandenen Ribonucleotidreduktase-Inhibitors dessen spezifische Abtrennung gelingt (s. Diskussion). Zum ersten Mal ist Ribonucleotidreduktase-Aktivität nach Vernalisation auch in Extrakten ein Jahr alter Weizensamen eindeutig nachgewiesen worden. Da jedoch durch diesen Prozeß ebenso zahlreiche andere stoffwechselphysiologische Veränderungen hervorgerufen werden, behält die Beobachtung weiterhin Gültigkeit, daß gravierende Unterschiede zwischen den Extrakten verschieden alter Weizensamen bestehen müssen, die zu unterschiedlichen Resultaten im in vitro-Experiment führen.

3.1.4 Bildung eines unbekannten Nucleotids während des Ribonucleotidreduktase-Tests mit Weizenextrakten

Bei der papierchromatographischen Auftrennung des Reduktase-tests tritt in unterschiedlichem Maße eine unbekannte, radioaktive Substanz auf, die allein auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens im Routinetest nicht identifiziert werden konnte. Diese Verbindung X (Abb. 5) unterscheidet sich vom Reaktionsprodukt dCMP nur geringfügig im R_F -Wert, ist jedoch im Unterschied zu diesem begrenzt perjodatempfindlich. Ein absoluter Wert für die Laufstrecke von X kann auf Grund der gewählten Bedingungen (s. 2.2.2) nicht angegeben werden; die relative Lage zu den Vergleichssubstanzen CMP, dCMP und Cytidin bleibt jedoch bei allen chromatographischen Analysen erhalten. Mit Sicherheit kann UMP, das Desaminierungsprodukt des Substrats, nach unseren früheren Untersuchungen ¹⁷ ausgeschlossen werden.

In *Vicia faba*-Extrakten findet man ebenfalls ein unbekanntes radioaktives Produkt im Inkubationsgemisch der Ribonucleotidreduktase-Tests ⁴¹. Dort konnte die Struktur als die eines im Zuckerrest 2'(3')-modifizierten Cytidin-derivates näher eingegrenzt werden. Die chromatographischen Eigenschaften (Abb. 5 und Abb. 6) sprechen für eine Identität von X in Vicia- und Weizenextrakten. Bei der Untersuchung von X in Vicia wurde der Frage wenig Beachtung geschenkt, ob es sich um ein mit der enzymatischen Ribonucleotidreduktion zusammenhängendes Neben- oder Zwischenprodukt handelt oder ob X in den Pflanzenextrakten völlig unabhängig von der Ribonucleotidreduktase-Bestimmung gebildet wird. Es war aussichtsreich und wünschenswert, diese Frage nach der Funktion für X mit Weizenextrakten zu entscheiden, da hier X in den meisten Fällen in größerer Menge aus CDP gebildet wird als das Reduktase-Produkt dCMP (Abb. 5 und Abb. 6). X wird sowohl von Weizenextrakten älterer als auch frischer Samen gebildet; die

Ausbeute war besonders hoch bei Verwendung älterer Erntejahrgänge (Jubilar 1967, Hanno 1969) mit bereits durch eine lange Lagerzeit eingeschränkter Keimfähigkeit sowie bei vernalisiertem Weizen.

Bemerkenswert ist das eigenartige Verhalten von X bei Behandlung mit NaJO_4 . Besprühen des Papierchromatogramms mit einer 1 %-igen NaJO_4 -Lösung, Elution mit Wasser und nachfolgende Rechromatographie läßt eine rasche Entscheidung zu, ob es sich um ein Ribotid oder Desoxyribotid handelt. Während die Substanz X nach Elution und Rechromatographie im borat-haltigen Laufmittel nach Reichard in unveränderter Menge und in der gleichen Position wiedergefunden werden kann, war nach einer NaJO_4 -Behandlung nur ein Teil der Radioaktivität in Cytosin lokalisiert. Unvollständige Spaltung mit Perjodat sowie einen vergleichbaren R_F -Wert zeigt auch das erwähnte beim Reduktasetest mit Vicia faba-Extrakten auftretende Nucleotid. Dieser Befund spricht ebenfalls für die Identität der Verbindungen und die diskutierte Substitution der 2'- oder 3'-Position der Ribose mit einem langsam wieder abspaltbaren Rest (z. B. Acylrest).

Die Bedingungen der Bildung von X in Weizenextrakten werden im folgenden beschrieben. X muß enzymatischer Natur sein, da CDP-Lösungen bei Inkubation mit den Komponenten eines Ribonucleotidreduktase-Tests (ohne Protein) allenfalls Dephosphorylierung und Desaminierung erleiden. Erste Hinweise, daß - zumindest im Weizen - die Bildung von X nicht ursächlich mit der Bildung von Reduktionsprodukt verknüpft ist, zeigt das zeitliche Auftreten dieser Substanz. Weizenembryonen wurden im Bereich von 2 bis 16 Stunden Keimzeit alle 2 Stunden geerntet und auf Reduktase-Aktivität geprüft. Dabei zeigte sich, daß X erstmals nach einer Keimzeit von 6 Stunden deutlich auftrat und nach 16 Stunden zwar noch nachweisbar, jedoch schon wieder vermindert war. Das Maximum seiner

Bildung lag zwischen 6 und 14 Stunden. In diesem Zeitraum war es aber nie möglich, Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Weizenextrakten zu finden.

Mit keiner bekannten Ribonucleotidreduktase wurde bisher irgendein Zwischenprodukt der Reduktion Ribotid $\rightarrow$ Desoxyribotid gefunden; das schließt zwar seine Existenz und das zeitliche Auftreten vor Produktbildung nicht aus, aber eine Anhäufung in größerer Menge und in einem Zeitabstand von mehreren Stunden sind doch in hohem Maße unwahrscheinlich. Diese Vermutung wird durch die folgenden Versuche bestätigt. X wurde von Papierchromatogrammen eluiert und als Substrat mit frisch hergestelltem Weizenextrakt inkubiert (3 Std., 30° C). Weder mit noch ohne Zugabe von Reduktionsmittel (DTT) fand irgendein Umsatz oder eine Produktbildung gegenüber mit Puffer inkubierten Kontrollproben statt; X ging aus allen Inkubationen unverändert hervor. Weiterhin wurde X in unverminderter Menge gebildet, wenn das im Reduktasetest verwendete Substrat [^3H]CDP durch [^3H]CMP ersetzt wurde. Die Größe des Peaks X auf den Chromatogrammen war völlig unabhängig von der Anwesenheit von DTT und von ATP im Test; dagegen konnte bei Zusatz von Magnesiumionen eine Stimulierung beobachtet werden. Diese Versuche beweisen, daß für die Bildung von X eindeutig andere Faktoren bestimmend sind als für den Ribonucleotidreduktase-Nachweis in Weizenextrakten (Tab. 3) und daß es sich bei X um kein Zwischenprodukt handeln kann.

Es bleibt jedoch unabhängig hiervon interessant und aufschlußreich, mehr über die Natur dieser Substanz zu erfahren und die Voraussetzungen für ihre Bildung zu kennen, die in keinen uns derzeit bekannten Reaktionsweg für Pyrimidinnucleotide einzugliedern ist. Zudem ist die auf ein 2'- bzw. 3'-modifiziertes Cytidinnucleotid eingegrenzte Strukturmöglichkeit bemerkenswert, da modifizierte Mononucleotide nicht und modifizierte Nucleoside selten in der Natur auftreten. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden,

daß auch für die Bildung des natürlich vorkommenden 3'-Desoxyadenosins (Cordycepin) ein reduktiver Mechanismus ähnlich der 2'-Desoxyribonucleotid-Synthese postuliert wird.⁹⁹

Tab. 3 Bildung von Reduktionsprodukt dCMP und von X (+) im Standardtest mit Weizenextrakten

Ribonucleotidreduktase-Test	dCMP (%)	X
Standard +[³ H] CDP	100	+ *
-[³ H] CDP, +[³ H] CMP	0	+
+ [³ H] CDP, -DTT	0-20	+
+ [³ H] CDP, -ATP	50	+
+ [³ H] CDP, +Mg ⁺⁺ (5 mM)	100	++

* Menge >dCMP-Menge, aber auf den Papierchromatogrammen meist nur qualitativ erfaßbar (s. Abb. 5).

3.2 DNA-Markierung durch Ribonucleoside

Die in vitro-Experimente zum Nachweis der Ribonucleotid-reduktase-Aktivität - wie oben beschrieben - zeigten erhebliche und zunächst unverständliche Unterschiede je nach dem Erntejahr des verwendeten Weizens. Das Studium der DNA-Synthese durch Pulsmarkierung bietet eine gute Möglichkeit, die metabolische Situation auch in vivo zu verfolgen.

DNA-Einbauversuche mit radioaktiven Vorläufern - meist Thymidin - werden mit den verschiedensten Organismen unternommen, um Beginn und Verlauf der DNA-Synthese festzustellen. Da die Zellmembran intakter Zellen eine Barriere für phosphorylierte Verbindungen darstellt, müssen Nucleoside verwendet werden. Thymidin wird relativ schnell in die DNA eingebaut, obwohl diese Verbindung keine normale Zwischenstufe der Biosynthese ist (vgl. Abb. 4). Es hat

sich jedoch herausgestellt, daß die meisten Zellen aus noch unbekannten Gründen das mit dem Medium angebotene Nucleosid bevorzugt für ihre Nucleinsäuresynthese verwenden⁸⁵. Extrakte aus Weizen können mit hoher Effizienz Thymidin phosphorylieren; die Reaktion wird wahrscheinlich durch eine unspezifische Phosphotransferase⁸⁰ katalysiert.

Über den Reduktase-Weg zur Bereitstellung von DNA-Vorläufern sagt jedoch DNA-Markierung mit Desoxyribonucleosiden nichts aus. Wenn es dagegen gelingt, den Einbau von Ribonucleosiden als intakte Moleküle in die DNA nachzuweisen, so können diese nur über Phosphorylierung, Ribonucleotidreduktase-Reaktion und Polymerisation dort hingelangt sein. Diese Art der Markierung und des Nachweises von Ribonucleotidreduktion in vivo geht auf ein klassisches Experiment von Reichard (1950)⁹⁵, nämlich Einbau von [¹⁵N]Cytidin in RNA und DNA der Ratte, zurück. Sie ist in einigen besonders schwierigen Fällen des Ribonucleotidreduktase-Nachweises (Insektenpuppen⁹⁶, Amphibienlarven⁹⁷) angewandt worden und erschien auch hier beim Weizen als geeignete Alternative, die schwache *in vitro* demonstrierte Ribonucleotidreduktase-Aktivität des Weizens zu bestätigen und den Altersunterschied zu studieren. Allerdings bedarf es eines größeren experimentellen Aufwandes, die aus einem Ribonucleosid in DNA erscheinende Radioaktivität mit Sicherheit auf Ribonucleotidreduktion zurückzuführen, da andere Wege ("salvage pathway") zumindest denkbar, wenn auch in Eukaryonten nicht wahrscheinlich sind.

3.2.1 Radioaktivitätseinbau, Reinigung und Charakterisierung der DNA

Vorisiolierte Weizenembryonen wurden - wie im experimentellen Teil (2.3.1) beschrieben - auf Agar-Platten im Normalfall 18 Stunden angekeimt und dann 2 Stunden lang in Glucose-Lösung mit radioaktivem Nucleosid inkubiert. Die zwei-

stündige Markierung erwies sich in Vorversuchen (0,5 - 4 Stunden Markierung) als die bei gut nachweisbarem Einbau die am besten reproduzierbaren Werte liefernde Methode. Anschließend wurde die Weizen-DNA nach der Standardmethode mit SDS extrahiert, mit Alkohol gefällt, zum Abbau von begleitender und durch Ribonucleosid höher markierter RNA mit DNase-freier Ribonuclease A behandelt, erneut gefällt und schließlich über Hydroxylapatit-Säulen gereinigt. Diese Chromatographie trennt sowohl RNA-Reste (falls noch vorhanden) als auch einzelsträngige DNA-Fragmente (mit evtl. von der Gesamtmenge verschiedener spezifischer Markierung) ab und liefert reine, native, hochmolekulare DNA. Ihr T_m -Wert war 76°C (in 0,015 M NaCl/Citrat) bzw. 89°C (in 0,15 M NaCl/Citrat) in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten. Die Radioaktivität der Hydroxylapatit-Fraktion ist in dpm/OD-Einheit DNA ausgedrückt, da quantitative Extraktion und Reinigung der Gesamtmenge nicht möglich ist. Zum Vergleich der Werte für verschiedene Embryonenpräparationen erwies es sich außerdem als sinnvoll, noch auf die Proteinkonzentration des zentrifugierten Homogenats zu beziehen, da dieser Proteingehalt ungefähr dem Anteil der keimenden Embryonen an der insgesamt verwendeten gesiebten, aber niemals zu 100 % aus intakten Embryonen bestehenden Präparationen proportional ist. Der DNA-Beitrag nicht-keimender und nicht-markierter, geschädigter Embryonen wird damit etwas korrigiert, dürfte allerdings weiterhin für die Schwankungen von Experiment zu Experiment mitverantwortlich sein.

In Tab. 4 sind Ergebnisse der *in vivo*-Markierung von Weizenembryonen (Otus, Jahrgang 1972 bzw. 1974 = 1 Jahr alt) nach 18-20 Stunden Keimung mit Thymidin als Desoxyribonucleosid, Cytidin und Uridin als Ribonucleosiden sowie der Base Cytosin zusammengestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen Experimenten, sind in ihrer relativen Größe aber repräsentativ und im Einklang mit

seitdem von Schimpff & Follmann⁹⁸ ausgeführten weiteren Markierungen. Insbesondere sind die auch hier beobachteten altersabhängigen Unterschiede (vgl. 3.2.2) stets für mehrere Weizensorten und -Jahrgänge gesichert worden.

Tab. 4 Markierung von Weizenembryonen bei 18-20 Stunden Keimung durch Thymidin, Uridin, Cytidin und Cytosin (je 100 μCi ^3H bzw. 20 μCi ^{14}C /250 mg Embryonen in 1,2 ml Medium)

Experi- ment	Weizen	Nucleosid	spez. Aktivität (dpm/OD)	korrigierte spez. Akt. (dpm/OD·mg Protein)
III	Otus 74	$[\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}]$	66 300	10 800
	72	Thymidin	57 200	9 100
IX	Otus 74	$[6\text{-}^3\text{H}]$	2 000	270
	72	Uridin	11 900	2 700
IX	Otus 74	$[5\text{-}^3\text{H}]$	820	140
	72	Uridin	11 400	2 100
VI VII	Otus 74	$[5\text{-}^3\text{H}]$	2 400	340
	72	Cytidin	12 900	2 700
XXII	Kormoran 76	$[5\text{-}^3\text{H}]$	1 600	290
	72	Cytidin	10 700	1 800
III	Otus 74	$[\text{U-}^{14}\text{C}]$	840	160
	72	Cytidin	1 500	350
V	Otus 74	$[^{14}\text{C}]$	0	0
	72	Cytosin	70	0

Man erkennt aus der Tabelle einen kräftigen Einbau von Thymidin. Aber auch Inkubation mit Cytidin und Uridin führt zu einer Markierung der DNA während freies Cytosin gar nicht inkorporiert wird; schon dieser Befund weist darauf hin, daß die Ribonucleoside nicht auf dem Wege über Glycosidspaltung oder Umglycosidierung in DNA gelangen. Bei gleicher Ausgangsradioaktivität erscheinen die Ribonucleoside maximal zu $1/5 - 1/4$ der Thymidineinbau-Effizienz in der DNA; das ist plausibel, da ihre Hauptmenge (in phosphorylierter Form) RNA-Vorläufer ergeben wird. Während Cytidin nach der Basenanalyse (Tab. 5) zu $> 90\%$ im Cytosin der DNA gefunden wird, führt Markierung mit $[6-^3\text{H}]\text{Uridin}$ nur zu 20% markiertem Thymin neben 80% markiertem Cytosin; aus $[5-^3\text{H}]\text{Uridin}$ kann die Markierung überhaupt nur als Cytosin in die DNA gelangen. Das entspricht dem bekannten biosynthetischen $\text{U} \rightarrow \text{C}$ -Übergang (Abb. 4). Wegen der eindeutigen Verhältnisse bei $\text{C} \rightarrow \text{dC}$ wurde in der Folge nur Cytidin als Ribonucleosid eingesetzt.

Sehr bemerkenswert ist der Unterschied zwischen alten und neuen Samen. Thymidin wird annähernd gleich stark eingebaut, Ribonucleoside (via Ribonucleotidreduktion) jedoch in älteren Samen reproduzierbar 6-14 mal (im Durchschnitt etwa 10 mal) stärker als in Embryonen frischer Samen. Diese Analogie zur Ribonucleotidreduktion in vitro wird im folgenden Abschnitt noch deutlicher. Zum Nachweis der direkten Reduktion Cytidin $\rightarrow$ Desoxycytidin (auf phosphorylierter Stufe) diente eine DNA-Markierung mit uniform ^{14}C -markiertem Cytidin, das (nach saurer Hydrolyse) ca. 45% der Radioaktivität in der Base und 55% im Zucker besaß (in Base und Zucker spezifisch doppelt markierte Nucleoside sind nicht erhältlich). Wurde die ^{14}C -markierte DNA sowie das aus ihr durch HCOOH -Hydrolyse erhaltene ^{14}C -Cytosin unter Berücksichtigung des bekannten Cytosingehalts der DNA ($0,16\text{ Mol-\%}$) in der spezifischen Aktivität (dpm/OD-Einheit) verglichen, so fand sich im Cytosin 41% der DNA-Radioaktivität wieder (Tab. 5).

Tab. 5 Radioaktivitätsverteilung und spezifische Aktivität in DNA und DNA-Hydrolysat nach Cytidin- und Uridinmarkierung

	Markierung mit [U- ¹⁴ C]Cytidin	Markierung mit [5- ³ H]Cytidin	Markierung mit [6- ³ H]Uridin
Cytosin	7 435 dpm	2 395 dpm	2 070 dpm
Thymin	186 dpm	91 dpm	580 dpm
Guanin	0	0	0
Adenin	0	215 dpm	0
spez. Aktivität: eingesetztes [U- ¹⁴ C]Cytidin (524 mCi/mMol)			9 · 10 ⁷ dpm/OD
nach HCOOH-Hydrolyse Cytosin			4,1 · 10 ⁷ dpm/OD
DNA			1 500 dpm/OD
nach HCOOH-Hydrolyse Cytosin			3 800 dpm/OD

Der geringe ¹⁴C-Gehalt in Thymin ist vernachlässigt. Die Übereinstimmung mit dem Ausgangswert der spezifischen Aktivität (45 %) ist sehr befriedigend und mit einer zwischen Cytidin und Desoxycytidin eingeschalteten N-Glycosidspaltung nicht zu vereinbaren; in diesem Fall hätte die Ribose-Markierung verlorengegangen sein und annähernd 100 % der DNA-Radioaktivität im Cytosin lokalisiert sein müssen.

Markierungsexperimente an Pflanzen sind besonders kritisch im Hinblick auf eine bakterielle Kontamination der Versuchssätze zu betrachten⁸³, die einen hohen Einbau des betreffenden Tracers in die DNA vortäuschen könnte. Wir machten von einer zusätzlichen Möglichkeit Gebrauch, um die oben beschriebenen Einbauversuche zu überprüfen und die Messung von Artefakten zu vermeiden. Auf Methylalbumin/Kieselgur-(MCK)-Säulen^{82,83} trennen sich pflanzliche und bakterielle DNA auf Grund ihrer unterschiedlichen Basen-

zusammensetzung⁸³. Wir konnten an den markierten Desoxyribonucleinsäuren von Weizen zeigen, daß die Verteilung der Radioaktivität und der Verlauf der UV-Absorption völlig übereinstimmen (Abb. 7) und offensichtlich sonst keine hochmarkierte, aber mengenmäßig geringe, an anderer Stelle chromatographierende DNA vorhanden war. Dieser Befund schließt die Anwesenheit bakterieller DNA aus und beweist, daß das verwendete Pflanzenmaterial nicht kontaminiert war.

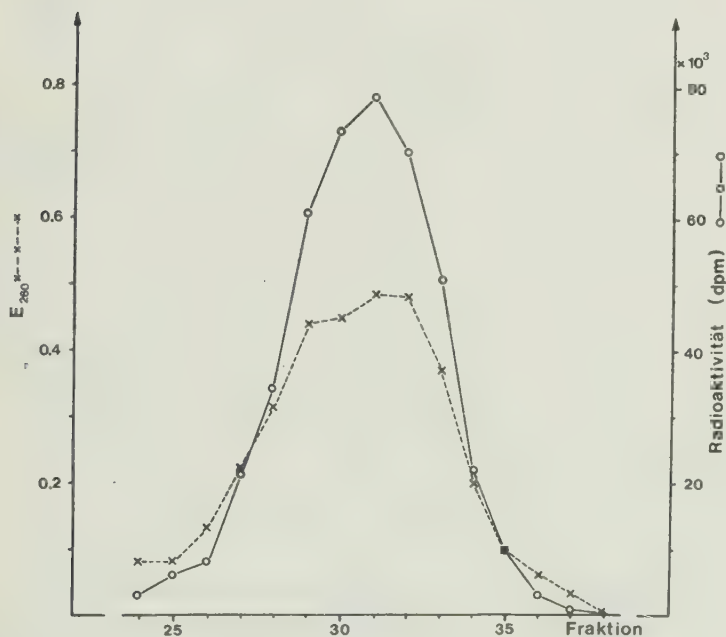


Abb. 7

UV-Absorption und Radioaktivitätsverteilung markierter Weizen-DNA nach Chromatographie auf einer Methylalbumin/Kieselgur-Säule.

3.2.2 Zeit- und Altersabhängigkeit

In einer zweiten Serie von Einbauexperimenten wurde die Zeitabhängigkeit der DNA-Markierung durch Thymidin und Cytidin für Embryonen aus alten und neuen Weizen (Otus 1972 bzw. 1974) zwischen 5 und 30 Stunden Keimdauer verfolgt (Tab. 6, 7 und 8). Aus technischen Gründen ließen sich niemals alle Zeitpunkte mit aliquoten Mengen derselben Embryonenpräparation erfassen, und in getrennten Experimenten ergab der Cytidineinbau zwischen 20 und 30 Stunden stark unterschiedliche spezifische DNA-Aktivitäten. Abb. 9 zeigt aber dennoch einen bestimmten Gang der Werte, der stets reproduzierbar war.

Man erkennt, daß der Thymidin-Einbau in beiden Erntejahrgängen praktisch identisch ist (ein guter Hinweis auf genügende Präzision der experimentellen Bedingungen) und zwischen 15-18 Stunden ein Maximum aufweist (Abb. 8). Es ist bekannt, daß zu dieser Zeit die Keimlinge die erste S-Phase durchlaufen. Die in frischem Weizen beobachtete starke Wiederabnahme der DNA-Synthese ist typisch für das teilsynchronisierte System und des öfteren beschrieben worden ^{81,100}. Die weitere Thymidineinbau-Zunahme im gealterten Embryo muß als atypisch gelten und veränderte Replikationsverhältnisse anzeigen; dies wurde nicht weiter untersucht.

Interessanter für diese Arbeit ist der gravierende Unterschied beim Cytidineinbau, wenn Embryonen verschiedenen Alters verwendet wurden. Bei 15 Stunden wird in beiden Weizenproben kein Cytidin in DNA überführt, und im frischen Weizen erreichen die Werte auch bis 35 Stunden höchstens das 4-fache des Blindwertes. Dagegen erfolgt im gealterten, keimenden Weizenembryo zwischen 15 und 30 Stunden ein zweifelsfrei nachweisbarer auf Ribonucleotidreduktion (s. o.) beruhender Cytidineinbau mit zunehmender Tendenz; diese Werte erreichen das 10-fache des Blindwertes und mehr als das 5-fache des höchsten beobachteten Cytidineinbau-Wertes von frischem Weizen.

Die Analogie zum Ribonucleotidreduktase-Nachweis in vitro bei altem und frischem Weizen ist unverkennbar. Mögliche Ursachen dieses unterschiedlichen Verhaltens werden später diskutiert.

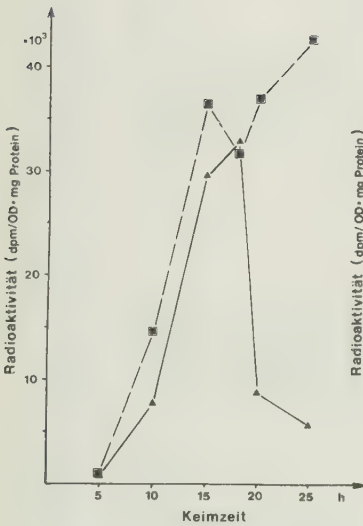


Abb. 8

$[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbau

■ Otus 1972

▲ Otus 1974

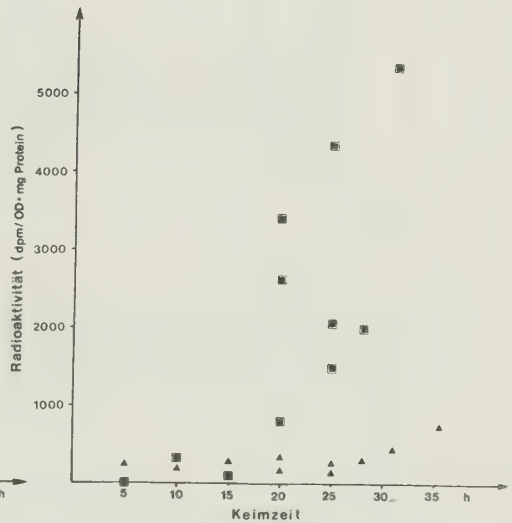


Abb. 9

$[^3\text{H}]$ Cytidin-Einbau

■ Otus 1972

▲ Otus 1974

Tab. 6 Zeitabhängigkeit der DNA-Markierung durch [^3H]Thymidin (100 μCi in 1,2 ml Medium)
in Weizenembryonen von Otus 1972 und 1974

Weizen	Keimzeit (h)	Protein (mg/ml)	DNA-Markierung (dpm)	spez. Aktivität (dpm/OD)	korrigierte spez. Akt. (dpm/OD-mg Protein)
Otus 1972	5	2,9	28 053	2 873	990
	10	2,2	429 195	32 113	14 600
	15	2,8	656 636	101 962	36 420
	18	2,1	963 437	66 905	31 860
	20	2,0	106 992	74 300	37 150
	25	1,4	257 450	59 872	42 770
Otus 1974	5	4,8	45 209	3 772	790
	10	4,8	489 317	37 069	7 720
	15	5,2	1 218 119	153 958	29 610
	18	4,8	920 195	158 179	32 950
	20	3,9	597 723	34 471	8 840
	25	3,6	359 170	20 654	5 740

Tab. 7 DNA-Markierungsexperimente mit [^3H]Cytidin (100 μCi in 1,2 ml Medium)
in Abhängigkeit von der Keimzeit; Embryonen aus Otus 1972

Experiment	Keimzeit (h)	Protein (mg/ml)	DNA-Markierung (dpm)	spez. Aktivität (dpm/OD)	korrigierte spez. Akt. (dpm/OD·mg Protein)
I	5	5,6	0	0	0
	10	5,6	13 100	1 867	330
	15	5,0	3 258	494	100
	20	4,9	103 785	12 877	2 630
	25	4,5	62 179	9 253	2 060
II	15	2,0	3 581	508	250
	20	2,1	11 101	1 685	800
	25	2,1	31 042	3 112	1 480
	28	2,5	47 615	4 991	2 000
	32	1,8	95 725	9 664	5 370
III	20	5,8	64 188	19 811	3 420
	25	4,3	34 125	18 750	4 360

Tab. 8 [^3H]Cytidineeinbau in die Weizen-DNA von Otus 1974,
Bedingungen wie Tab. 7

Experiment	Keimzeit (h)	Protein (mg/ml)	DNA-Markierung (dpm)	spez. Aktivität (dpm/OD)	korrigierte spez. Akt. (dpm/OD·mg Protein)
IV	5	6,3	22 074	1 665	260
	10	5,1	14 613	1 135	220
	15	6,3	24 974	1 746	280
	20	7,0	31 513	2 366	340
	25	6,5	71 296	7 216	1 110
V	20	5,3	15 044	955	180
	25	6,0	23 029	1 523	250
	28	5,0	19 684	1 528	310
	32	5,8	35 404	2 682	460
	36	6,3	54 914	4 700	750
VI	20	7,5	45 126	2 453	330
	25	7,5	16 744	1 071	140

Die Nucleosid-Einbauversuche in vivo waren äußerst langwierig und konnten nicht in beliebiger Zahl durchgeführt werden. Als Ansatz zu einer Interpretation wurde noch geprüft, ob ein Extrakt (30 000 g-Überstand) aus frischen Weizenembryonen die Markierung älterer beeinflusst (Tab. 9). In zwei verschiedenen Experimenten ergab sich eine sehr starke Hemmung des Cytidineinbaus, die auch bestehen blieb, wenn der zugesetzte Weizenextrakt zuvor 10 min bei 100° C erhitzt und vom größten Teil seiner Proteine befreit wurde. Dieser Befund konnte inzwischen von Schimpff & Follmann⁹⁸ in einer Reihe weiterer Versuche in vivo und in vitro vollauf bestätigt werden. Gleichzeitig ist eine partielle Reinigung und vorläufige Charakterisierung der inhibierenden Fraktion im Gange.

Tab. 9 Markierung von älteren Weizenembryonen bei 18-20 Stunden ohne und mit Extrakten aus frischen Weizenkeimlingen. Nucleosideinbau-Bedingungen wie genannt.

Weizen	Nucleosid	Zusatz	$\frac{\text{dpm/OD}}{\text{mg Protein}}$	relativ (%)
Otus 1972	[³ H]Cytidin	ohne	2 500	100
		Extrakt aus Otus '74		
Otus 1972	"	ca. 10 mg Protein	1 880	75
Otus 1972	"	ca. 20 mg Protein	590	24
Otus 1972	"	ca. 20 mg Protein 10 min, 100° C, zentrifugiert	830	35
Kormoran 1972	[³ H]Cytidin	ohne	3 200	100
		Extrakt Kormoran '75		
Kormoran 1972	"	> 20 mg Protein	140	5

3.3 dATP- und dTTP-Bestimmung in Extrakten aus Weizenembryonen

Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP), die Substrate der DNA-Polymerasen, kommen in der lebenden Zelle im Vergleich zu den Ribonucleosidtriphosphaten nur in äußerst geringen Mengen vor, so daß ihre analytische Erfassung bis vor kurzer Zeit erhebliche Schwierigkeiten bereitete. Frühere Methoden benutzten ³²P-Phosphat, das zum Kulturmedium gegeben wurde, und die Auftrennung der markierten Nucleotide nach der Extraktion erfolgte chromatographisch. Dies war nicht nur mit einem großen Aufwand verbunden, die Ergebnisse ließen sich auch schlecht reproduzieren, da die so gemessenen Werte von verschiedenen Parametern wie Aufnahme des radioaktiven Phosphats, Phosphorylierungseffizienz der Zelle und endogenen Nucleotidegehalten abhängig waren. Ein allgemein geeigneteres Verfahren zur Bestimmung von dNTP wurde erstmals von Solter & Handschumacher ⁸⁴ beschrieben. Das zu bestimmende Triphosphat wird dabei zum begrenzenden Faktor der DNA-Polymerase-Reaktion gemacht unter Verwendung von nativer DNA als Matrize. Die Methode wurde von Lindberg & Skoog ^{32,33} dahingehend modifiziert, daß anstelle von DNA synthetische Polydesoxyribonucleotide als Matrize eingesetzt wurden, die nur 2 Basen enthielten. Bei Verwendung von Poly(dA-dT) ist der Einbau von radioaktiv markiertem dATP, das im Überschuß angeboten wird, proportional zur Menge des zu bestimmenden dTTP. Durch Einsatz von dTTP kann umgekehrt eine unbekannte Menge dATP bestimmt werden.

Diese direkte Methode kommt bei den hier beschriebenen dNTP-Bestimmungen zur Anwendung.

3.3.1 Standardbedingungen für die Polymerase-Reaktion

Da der Einbau von Radioaktivität in säureunlösliches Produkt stark von der DNA-Polymerasepräparation, der verwendeten Enzymkonzentration und der Inkubationsdauer abhängt, mußten zu Beginn der Experimente Standardbe-

dingungen gefunden werden, die einen optimalen und mit steigender Konzentration von dNTP linearen Einbau gewährleisten.

Mit 0,1 U E. coli-DNA-Polymerase I pro Testansatz wird nach einer Stunde fast doppelt so viel Radioaktivität eingebaut wie mit 0,5 U (Abb. 10). Nach einem anfänglich starken Anstieg der Zeitkurve sieht man, daß zwischen 45 und 60 Minuten die Reaktion mit Sicherheit ein Plateau erreicht hat. Die Erreichung eines Plateaus ist unbedingt notwendig für einen mit der Menge linearen Einbau von begrenzendem Nucleotid. Abb. 11 zeigt, daß man bei Inkubation verschiedener Mengen dATP unter den so gewählten Standardbedingungen eine Gerade erhält.

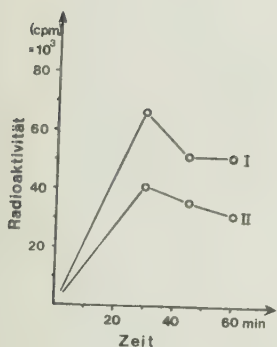


Abb. 10

Zeitabhängigkeit der Polymerase-Reaktion bei 2 Enzymkonzentrationen

I 0,1 Einheiten pro Testansatz

II 0,5 Einheiten pro Testansatz

dATP (9,2 pM) wurde konstant gehalten

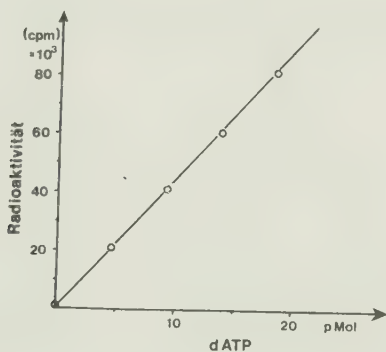


Abb. 11

Linearität des Polymerase-Tests: Inkubation verschiedener dATP-Mengen unter Standardbedingungen (60 min, 0,1 U DNA-Polymerase)

Wenn die dATP- und dTTP-Gehalte in Methanolextrakten aus Weizen gemessen wurden, war - besonders im Falle der dATP-Bestimmung - meist eine nachträgliche Korrektur der Werte notwendig. Sie erfolgte nach der Methode von Munch-Petersen, Tyrsted & Dupont ³⁶, die in Betracht zieht, daß die spezifische Aktivität des markierten dNTP durch das aus dem Zellextrakt stammende gleiche Desoxyribonucleotid herabgesetzt wird. Unter Berücksichtigung der Isotopenverdünnung zeigt die Reaktion wieder die von der Extraktmenge abhängige und erwartete Linearität (Abb. 12).

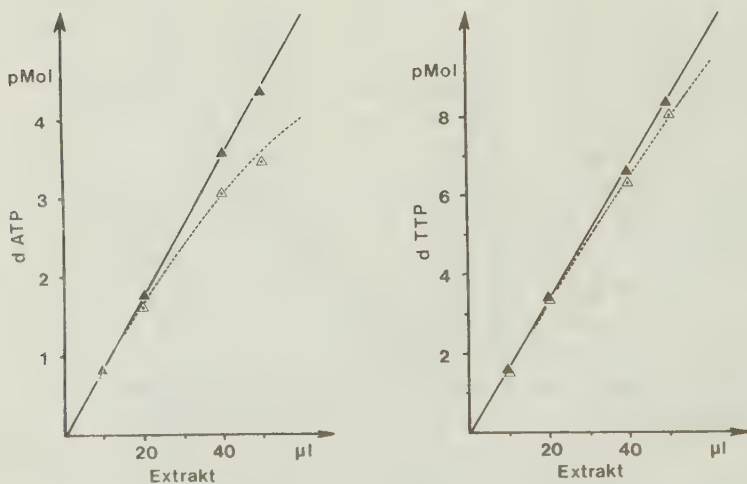


Abb. 12

Beziehung zwischen den in dem Standardtest eingesetzten Extraktmengen und den dATP- und dTTP-Gehalten

- Δ gemessene Werte
- ▲ nach Korrektur

Die dNTP wurden aus den homogenisierten Weizenembryonen durch 60 %-iges Methanol extrahiert. In der Literatur findet man meist Angaben über eine Extraktionsdauer von 16 bis 20 Stunden bei -20°C . Dies wäre für eine Aufarbeitung der zu verschiedenen Keimzeiten zwischen 0 und 20 Stunden erhaltenen Weizenextrakte wenig praktikabel gewesen, dennoch sollte eine möglichst vollständige Gewinnung der dNTP gewährleistet sein. Die in Tab. 10 aufgeführten Daten zeigen, daß der gemessene dATP-Gehalt von der Extraktionsdauer bei -20°C unabhängig ist. Zwischen 15 und 37 Stunden konnten im Test gleiche dATP-Mengen nachgewiesen werden. Außerdem ist ersichtlich, daß die Werte unter den gewählten Testbedingungen mit einer Standardabweichung von $\pm 7\%$ bestimmbar sind.

Tab. 10 dATP-Gehalt in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer bei -20°C . Abweichung der Meßwerte unter Standardbedingungen

Extraktionsdauer (h)	$[^3\text{H}]\text{dTTP}$ -Einbau (cpm)	dATP-Gehalt (pMol)	
15	2 003	0,4	$\bar{m} = 0,39$ $s = 0,026$ $\Delta \pm 7\%$
18	1 790	0,375	
21	1 727	0,35	
24	1 906	0,4	
27	2 058	0,425	
37	2 030	0,4	

Entgegen anderen Angaben ⁸⁵ hatte die Anwesenheit von Methanol unter den beschriebenen Bedingungen einen Einfluß auf die Polymerase-Reaktion. In Gegenwart von Methanol wurde nicht nur ein geringerer Einbau festgestellt, die erhaltenen Eichkurven wiesen auch eine andere Steigung auf. Um dennoch methanolhaltige Extrakte ohne Abtrennung des Alkohols messen zu können, wurde den

Testansätzen für die Eichkurve ebenfalls eine entsprechende Menge Methanol zugesetzt. Dies war besonders dann notwendig, wenn - wie bei der dNTP-Bestimmung mit Extrakten frischer Weizensamen - Störungen beim Test durch Anwesenheit einer oder mehrerer interferierender Substanzen auftraten und die Verwendung zuvor konzentrierter bzw. größerer Extraktmengen unmöglich war.

3.3.2 Extraktion von dATP und dTTP

Die zu bestimmenden dNTP-Poolgrößen sind eventuell stark abhängig von der verwendeten Extraktionsmethode³⁶. Für ein ideales Verfahren zur Extraktion metabolischer Zwischenstufen und Produkte aus Geweben gelten folgende Kriterien.

1. Alle Enzyme sollten sofort durch das Extraktionsmittel denaturiert werden. Dieses darf aber keinen chemischen Abbau der zu untersuchenden Substanz verursachen.
2. Alle interessierenden Verbindungen sollten sich ohne Verluste in der löslichen Fraktion befinden.
3. Der Extrakt sollte so beschaffen sein, daß der nachfolgende Test nicht gestört wird.
4. Das ganze Verfahren sollte einfach sein und so wenig wie möglich Schritte umfassen, damit eine maximale Ausbeute und Wiedergewinnung der gesuchten Verbindungen gewährleistet ist.

Die beispielsweise in HeLa¹⁰¹ und Hamsterzellen²² angewandte Extraktion der dNTP mit 0,5 N Perchlorsäure genügte bei dem hier untersuchten Pflanzenmaterial nicht den formulierten Kriterien und erwies sich - im Gegensatz zu der später verwendeten Extraktion mit 60 %-igem Methanol - als undurchführbar. Wurde eine bestimmte Menge dATP kurz vor der HClO_4 -Zugabe zum Rohextrakt gegeben, so konnte die Substanz im Test nicht wiedergefunden werden. Dieser Befund kann folgendermaßen erklärt werden: Es ist bekannt, daß erstens Säuren nicht in der Lage sind, Enzyme mit Phosphatase-Aktivität in Gewebeextrakten höherer

Pflanzenzellen vollständig zu zerstören, und zweitens ist eine Copräzipitation der gesuchten Phosphorsäure-ester mit KClO_4 nicht auszuschließen⁸⁶. Unabhängig davon zeigte sich, daß die Polymerase-Reaktion durch Gegenwart höherer Salzkonzentrationen beeinträchtigt wird und die Wiedergewinnung von dATP unter HClO_4 -Extraktionsbedingungen auch ohne Anwesenheit von Rohextrakt nur zwischen 50 und 70 % betrug. Ähnliche Resultate wurden erzielt, wenn aus dem gleichen Pflanzenmaterial parallel eine Extraktion mit Perchlorsäure und Methanol erfolgte. Unter der Annahme einer hundertprozentigen Extraktion mit Methanol entsprachen die gemessenen Werte bei HClO_4 -Behandlung nur etwa 20 %. Auch Grzelczak und Buchowicz⁸⁷, deren Untersuchungen zum Ziel hatten, den Gehalt an freien Basen und Nucleosiden in keimenden Weizenembryonen zu bestimmen, betonen, daß deren Nachweis erst durch eine zusätzliche Äthanolbehandlung der HClO_4 -Extrakte gelang. Die Autoren vermuten, daß durch die Äthanolbehandlung interferierende Substanzen, z. B. Kohlenhydrate weggeschafft werden, und Äthanol Verluste durch Oberflächenabsorption und Copräzipitation verhindert.

Alkohole können jedoch auch als Wasseranaloge für hydrolytische Enzyme dienen⁸⁸. Diese Enzyme überstehen nicht nur die Alkoholbehandlung, sie sind unter den genannten Bedingungen sogar in der Lage, Alkohole und andere Verbindungen auf Kosten der Nucleotide zu phosphorylieren. Diese Tatsache muß zu falschen Resultaten führen und bedarf einer Überprüfung. Gleichzeitig ist nicht auszuschließen, daß der in trockenen Weizenembryonen nachgewiesene hohe Magnesium- und Eisengehalt (s. 2.6) einen metallkatalysierten Abbau⁸⁹ der Triphosphate begünstigen kann.

Das Ausmaß des Abbaus der Desoxyribonucleosidtriphosphate zu den entsprechenden Di- und Monophosphaten durch Rohextrakte kann festgestellt werden, wenn man zu diesen gleichzeitig mit dem Methanol radioaktives dATP bzw.

dTTP gibt. Die Analyse erfolgte entweder sofort oder nach einer 20-stündigen Aufbewahrung bei -20°C . Um den Einfluß zwischengeschalteter Schritte zu kontrollieren, wurden die Extrakte teilweise wie Proben behandelt und vor der papierchromatographischen Trennung der Phosphate an der Gefriertrocknung konzentriert (Tab. 11).

Tab. 11 Bestimmung des relativen [^3H]dTTP-Abbaus durch Rohextrakte aus Weizenembryonen (Kormoran 1972 und 1976). Die Methanolextrakte wurden an der Gefriertrocknung konzentriert. Die papierchromatographische Trennung der Phosphate erfolgte entweder sofort (I) bzw. nach 20 Stunden Aufbewahrung bei -20°C (II). Die Menge von dTMP war gering und wurde vernachlässigt.

Rohextrakt aus	I		II	
	dTTP (%)	dTDP (%)	dTTP (%)	dTDP (%)
- (Kontrolle)	92	8	87,5	12,5
1972	89	11	86	14
1976	61	39	74	26

Die halbquantitative Auswertung der Chromatogramme ergab, daß das dTTP/dTDP/dTMP-Verhältnis unabhängig davon war, ob die Proben direkt oder nach der Konzentrierung verwendet worden waren (Tab. 12 und Tab. 11). Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß unterschiedliche Mengen dTTP durch die Extrakte abgebaut wurden. Im allgemeinen resultierte ein ungünstigeres Verhältnis bei Extrakten aus frisch geernteten Weizensamen (Kormoran 1976). Der Abbau bei Verwendung solcher Extrakte ging so weit, daß von einer zum Rohextrakt zugesetzten dATP-Menge nur noch maximal 14 % im Polymerasetest wiedergefunden wurden.

Tab. 12 [^3H] dTTP-Abbau in Gegenwart von "Chelex" (+) bzw. ohne "Chelex" (-) durch Rohextrakte von Kormoran 1972 und 1976. Die Analyse der Produkte erfolgte direkt aus dem Methanolextrakt entweder sofort (I) oder nach 20 Stunden (II); II a) Werte der papierchromatographischen Analyse, II b) Werte der Analyse auf PEI-Cellulose.

Rohextrakt aus Kormoran	"Chelex"	I			II					
		dTTP (%)	dTDP (%)	dTMP (%)	dTTP (%)		dTDP (%)		dTMP (%)	
					a	b	a	b	a	b
- (Kontrollen)	-	92	5,5	2,5	90	94	6,5	0	3,5	0
-	+	94,5	5,5	0	91,5	-	8,5	-	0	-
1976	-	72	23,5	4,5	64	53	32	40	4	7
1976	+	90,5	9,5	0	90	100	10	0	0	0
1972	-	72	25	3	71	60	26	37,5	3	2,5

Andererseits war 80 % bzw. 95 % der dATP-Menge nachweisbar, wenn diese Verbindung erst zu den zentrifugierten Methanol-extrakten gegeben wurde und nach Konzentrierung aliquote Teile der Lösung in den Test eingesetzt wurden. In den beschriebenen Fällen konnte somit eindeutig die Anwesenheit einer den Testverlauf störenden Substanz ausgeschlossen werden, die den vollständigen Nachweis von dATP - wie oben angegeben - in Polymerase-Testansätzen verhinderte. Die Situation in Weizenextrakten neuer Erntejahrgänge wurde wiederum durch Zugabe von radioaktivem dATP und anschließende papierchromatographische Trennung der Produkte untersucht. Es zeigte sich, daß bereits nach einer Stunde unter Methanolextraktionsbedingungen das Diphosphat Hauptprodukt war. Der drastische Abbau konnte verhindert werden, wenn die Extrakte EDTA (5 bzw. 10 mM) enthielten oder der Rohextrakt vor der Methanolextraktion gekocht wurde (10 min, 100° C). Beide Methoden konnten jedoch nicht zur Anwendung gelangen, da EDTA die DNA-Polymerase (als Metalloenzym) stark hemmt, auch wenn die Magnesiumkonzentration im Test den Verhältnissen entsprechend erhöht wurde. Versuche, die dNTP aus *Chlamydomonas*⁴⁸ mit kochendem Wasser zu extrahieren, sind beschrieben worden. Zwar werden durch 5-minütiges Kochen der Weizenextrakte nicht alle dNTP zerstört, jedoch konnte nach einer solchen Behandlung nur etwa die Hälfte der unter Standardbedingungen erhaltenen Werte gemessen werden.

Die Verwendung des polymergebundenen Komplexbildners "Chelex" erlaubte erstmals einen stetigen Nachweis von dATP und dTTP auch in Extrakten frischer Weizensamen. "Chelex" verhinderte den Abbau der Triphosphate (Tab. 12) und störte die enzymatische Reaktion nicht, da es sich aus den methanolischen Lösungen vor dem Test leicht durch Zentrifugation entfernen ließ. Ob "Chelex" den Testverlauf störende Metallionen komplexiert oder ob es metallionen-abhängige enzymatische bzw. nicht-enzymatische Abbaureaktionen unterdrückt (oder beides), läßt sich

auf Grund der Befunde schwerlich entscheiden. Daß man mit einer Pyrophosphatase-Aktivität in methanolhaltigen Lösungen rechnen sollte, zeigen Untersuchungen mit Lymphocytenextrakten ³⁶. Auch dort liegen - im Vergleich zu Kontrollproben ohne Rohextrakt - mindestens 10 % der Triphosphate als Diphosphat vor.

Die Gegenwart den Testverlauf störender Substanzen aus dem Zellextrakt kann durch Mischungsexperimente untersucht werden. Bei gleicher Extraktionsweise der Rohextrakte wird dem Methanolextrakt vor dem Test eine bekannte Menge des zu bestimmenden dNTP zugegeben. Setzt sich die wiedergewonnene Menge dann additiv aus dem gemessenen dNTP-Gehalt des Extrakts und der zugefügten Menge zusammen, kann die Anwesenheit störender Substanzen ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse solcher Experimente sind in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13 Mischungsexperimente zur Prüfung möglicher endogener Störfaktoren in Rohextrakten aus Kormoran 1972.

Zusätze zum Polymerasetest	[³ H] dATP Einbau (cpm)	dTTP (pMol)
keine	510	0
2,16 pMol dTTP	3 855	2,15
0,025 ml Rohextrakt aus ungekeimten Embryonen (I)	310	0
0,025 ml Rohextrakt I + 2,16 pMol dTTP	3 793	2,1
	[³ H] dTTP Einbau (cpm)	dATP (pMol)
keine	1 290	0
2,49 pMol dATP	15 218	2,5
0,025 ml Rohextrakt aus 10 Stdn. gekeimten Embryonen (II)	14 773	2,4
0,025 ml Rohextrakt II + 2,49 pMol dATP	26 770	4,4

Wie man erkennt, kann aus trockenen Weizenembryonen (0 Std. Keimzeit), die kein dTTP enthalten, das zugesetzte dTTP vollständig nachgewiesen werden. Wenn Extrakte gekeimter Embryonen älterer Weizensamen (Kormoran 1972) verwendet wurden, war die Wiedergewinnung im allgemeinen kleiner und betrug zwischen 80 und 90 % (Tab. 13) d. h. in diesen Extrakten war eine geringe Menge den Test störender Substanzen nicht ausgeschlossen. Jedoch war die Bildung von säureunlöslicher Radioaktivität bei diesen Extrakten in einem großen Konzentrationsbereich proportional den eingesetzten Extraktmengen (Tab. 14).

Neben Mischungsexperimenten ist der Einsatz von zwei verschiedenen Konzentrationen im Polymerasetest eine weitere Möglichkeit, den Einfluß endogener Störfaktoren zu prüfen. Sie wurde bei allen folgenden Untersuchungen routinemäßig angewandt. Dabei zeigte sich, daß bei Verwendung gekeimter Embryonen frisch geernteter Weizensamen die eingebaute Radioaktivität nicht linear von der Extraktmenge im Test abhing. Im Gegenteil war die Situation in diesen Proben gerade umgekehrt; der gemessene dNTP-Gehalt konzentrierter Extrakte war kleiner, wenn mehr Extrakt getestet wurde. Erst bei direktem Einsatz der Methanolextrakte war die gemessene Radioaktivität wieder proportional zur verwendeten Extraktmenge. Die Eichung mußte dann auf Grund des geringen dNTP-Gehalts in einem für die exakte Bestimmung ungünstigen Konzentrationsbereich (0,2 bis 2 pMol pro Testansatz) erfolgen. Berichte über Störungen, die bei Verwendung größerer Extraktmengen aufgetreten sind und auf die Anwesenheit einer die Polymerasereaktion hemmenden Substanz schließen lassen, liegen auch von anderen Systemen (*Chlamydomonas*⁴⁸, Yoshida-Ascitestumorzellen³⁵) vor. Bei *Chlamydomonas*-Zellen wurde daraufhin die Extraktionsmethode geändert. Die Eichung und Analyse der dNTP in einem anderen, kleineren Konzentrationsbereich vorzunehmen, erwies sich - wie im Falle der Ascitestumorzellen - bei uns als einzig gangbarer Weg.

3.3.3 dATP- und dTTP-Poolgrößen

Tab. 14 und 15 zeigen die in Extrakten aus isolierten Weizenembryonen gemessenen dATP- und dTTP-Gehalte bei fortschreitender Keimung (0 bis 35 Std.) bezogen auf den DNA-Gehalt. Die DNA-Menge wurde fluorimetrisch ermittelt. Diese neue Methode mit Mithramycin als DNA-Reagenz wird ausführlich im experimentellen Teil unter 2.5.2 beschrieben.

In altem wie frischem keimendem Weizen (Ernte 1972 bzw. 1976) liegen im Embryo dATP- und dTTP-Mengen von 0,2-1 pMol pro μg DNA vor; in ungekeimten Samen sind beide Triphosphate nicht nachweisbar.

In Tab. 14 sind einerseits die Werte aufgeführt, wie sie mit unkonzentrierten Methanolextrakten (M-Extrakte) erhalten wurden, und andererseits die Meßdaten, wenn die Methanollösungen an der Gefriertrocknung (G-Extrakte) eingeeengt und 5-fach konzentriert in den Test eingesetzt wurden. Die letztgenannte Methode war - wo anwendbar - für eine genaue Bestimmung vorteilhaft, da unter diesen Bedingungen ein größerer Radioaktivitätseinbau beobachtet werden konnte. Wie ersichtlich treten lediglich bei einer Keimzeit von 5 und 10 Stunden Unstimmigkeiten hervor, die sich in einem unterschiedlichen Gehalt äußern. In beiden Fällen spricht der kleinere Wert bei konzentrierten Proben für die Anwesenheit einer den Polymerasetest hemmenden Substanz im Rohextrakt. Große Unterschiede in der absoluten Menge waren jedoch niemals vorhanden. Selbst bei Verwendung von Embryonen aus zwei verschiedenen Isolierungen, deren Keimung getrennt erfolgte, variierten die Meßwerte nur in einem kleinen Bereich. Beispielsweise wurden bei Kormoran 1972 nach 25 Stunden Keimungszeit folgende Werte erhalten:

1. Experiment		DNA-Gehalt ($\mu\text{g}/\text{ml}$ Roh- extrakt)		2. Experiment
dATP (pMol/ μg DNA)	0,28	349	307	0,16
dTTP (pMol/ μg DNA)	0,34			0,21

Tab. 14 dATP- und dTTP-Gehalt von keimenden Weizenembryonen (Kormoran 1972).

Die Methanolextrakte (M-Extrakte) wurden entweder direkt oder nach Entfernung des wäßrigen Methanols an der Gefriertrocknung (G-Extrakte) gemessen. Die G-Extrakte wurden 5-fach konzentriert in den Standard-Polymerasetest eingesetzt.

Keim- zeit (h)	DNA-Gehalt µg/ml Roh- extrakt	dATP			dTTP		
		M-Extrakte pMol/ml Rohextrakt	µg DNA	G-Extrakte pMol/ml Rohextrakt	M-Extrakte pMol/ml Rohextrakt	µg DNA	G-Extrakte pMol/ml Rohextrakt
0	218	-	-	0	-	-	0
5	299	96,5	0,32	144	251	0,84	94
10	271	291,5	1,08	96	302,5	1,12	95
15	307	96,5	0,31	77	94	0,31	85
20	349	55	0,16	38	68,5	0,2	72
25	349	99	0,28	98,5	119	0,34	122
30	335	-	-	98	-	-	126
35	335	-	-	94	-	-	128,5
							0,38
							0,38

Die dATP- und dTTP-Gehalte von Kormoran 1976-Extrakten (Tab. 15) unterscheiden sich größenordnungsmäßig nicht von denen des Jahrgangs 1972. Ihre Bestimmung war jedoch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Im besonderen konnte ein massiver Abbau von Desoxyribonucleosidtriphosphaten sowohl im Rohextrakt als auch in den Methanolextrakten festgestellt werden (s. 3.3.2). Außerdem traten bei Verwendung größerer Extraktmengen bzw. ankonzentrierter Extrakte Störungen beim Polymerase-Test auf, die in einer unvollständigen Erfassung der dNTP-Mengen resultierten. "Chelex" vermochte dem dNTP-Abbau entgegenzuwirken, und der Einsatz geringer Mengen (10 µl und 20 µl) unkonzentrierter Methanolextrakte machte nun auch bei Weizenembryonen frischer Samen eine exakte und parallel mit steigender Extraktkonzentration im Test zunehmende dNTP-Bestimmung möglich.

Tab. 15 dATP- und dTTP-Gehalte von keimenden Weizenembryonen aus Kormoran 1976. Es wurden Methanolextrakte für den Standardtest verwendet; DNA-Gehalt 500 µg/ml Rohextrakt

Keimzeit (h)	dATP-Gehalt		dTTP-Gehalt	
	pMol/ml Rohextr.	pMol/µg DNA	pMol/ml Rohextr.	pMol/µg DNA
5	169	0,34	150	0,3
10	212,5	0,43	155	0,31
15	325	0,65	500	1

Im Zusammenhang gesehen lassen die Ergebnisse der dATP- und dTTP-Bestimmung in Weizenextrakten (Kormoran) keine großen Unterschiede und keinen auffälligen Gang erkennen. Die dATP- und dTTP-Gehalte sind bei allen Erntejahrgängen (1972, 1975, 1976) vergleichbar groß und ändern sich im Verlauf der Keimung nicht wesentlich. Bemerkenswert - jedoch nicht unvermutet - ist, daß Desoxyribonucleosidtriphosphate niemals in trockenen, d. h. ungekeimten Embryonen nachgewiesen werden konnten. Es ist zu beachten, daß die dNTP-Mengen höher liegen können, wenn es gelänge - wie im Fall der Unterdrückung des dNTP-Abbaus mittels "Chelex" - auch die den Enzymtest störenden Substanzen vollständig zu entfernen. Gegenwärtig liegen keine Informationen über die Natur dieser Verbindung(en) vor, noch sind Methoden für ihre Abtrennung bekannt. Ein Ersatz der Polymerase-reaktion - etwa durch früher angewandte chromatographische Methoden - ist bei dem geringen dNTP-Gehalt keimender Weizenembryonen allerdings indiskutabel, so daß die hier beschriebenen Werte als derzeit zuverlässigste gelten müssen.

3.3.4 ATP-Gehalt von Weizenembryonen

Der ATP-Gehalt von keimendem Weizen ist früher gemessen worden¹⁰² und interessiert uns als eine Möglichkeit der Ribonucleotidreduktase-Aktivitätskontrolle über den Effektor ATP (s. u.). Im Zusammenhang mit der Bestimmung der dNTP-Mengen wurde auch an vier repräsentativen Proben (Kormoran 1972 bzw. 1975; 0 und 20 Stdn. Keimung) der ATP-Gehalt in Weizenextrakten mit Hilfe der Luciferin/Luciferase-Methode⁶¹ bestimmt; zum einen, um die Literaturwerte mit denen für unsere Weizensorten vergleichen zu können, zum anderen, um zu prüfen, ob die bei der dNTP-Messung in frischem Weizen festgestellten Schwankungen und Störungen generell Triphosphate betreffen oder dNTP-spezifisch sind.

Tab. 16 zeigt eindeutig, daß auch ATP in HClO_4 -Extrakten aus frischen, gekeimten Weizenembryonen instabil ist, während die (meist geringere) Menge in Extrakten aus ungekeimten Samen oder aus älteren, gekeimten Samen nur eine normale, lagerungsbedingte Abnahme erleidet. EDTA war auf die rapide Abnahme im ersten Fall ohne signifikanten Einfluß. Zusammen mit den oben genannten Erfahrungen muß man daher annehmen, daß trotz der denaturierenden Extraktionsbedingungen in frischen Samen ein Triphosphate abbauendes System, das nicht allein Metallionen sein kann, aktiv bleibt. Die Zunahme der ATP-Gehalte von trockenen zu keimenden Embryonen ist ähnlich wie beschrieben¹⁰².

Tab. 16 ATP-Gehalt ($\frac{\text{nMol}}{\text{g Embryonen}}$) in HClO_4 -Extrakten aus Weizenembryonen

Weizen	Extrakt frisch	nach 3 Tagen 4° C
ungekeimte Embryonen		
Kormoran 1972	11	12
Kormoran 1975	21	15
20 Stdn. Keimung		
Kormoran 1972	420	346
Kormoran 1975	1 340	30
Kormoran 1975	540 Messung sofort	< 10 _µ -EDTA
	92 nach 1 Std.	< 10 +EDTA
	47 nach 2 Stdn.	

4. Diskussion

4.1 Wahl des Untersuchungsobjektes

In dieser Arbeit werden Nachweis von Ribonucleotidreduktase in vitro, die Ribonucleotidreduktion in vivo und dATP- bzw. dTTP-Pools in Weizenembryonen beschrieben. Ribonucleotidreduktasen sind als induzierbare Enzyme am besten in rasch wachsenden Zellen und Geweben zu finden, und daher stammt die Mehrzahl der untersuchten Enzyme aus Bakterien- oder Sägetierzellen. Qualitativ und quantitativ gesehen sind die auf molekularbiologischer Grundlage faßbaren Ergebnisse der Nucleinsäuresynthese und Zellvermehrung bei höheren Pflanzen weit hinter diesen Systemen zurückgeblieben. Wenn auch die Allgemeingültigkeit des Biosynthesewegs von Desoxyribonucleotiden nunmehr in vielen Organismen demonstriert zu sein scheint, kann auf dem Gebiet der Ribonucleotidreduktion in Pflanzen eine große Lücke festgestellt werden, die angesichts der Bedeutung dieser Reaktion für Zellteilung und -Differenzierung unverständlich ist. Vor Beginn der eigenen Arbeiten lagen beispielsweise keine eindeutigen Angaben über Ribonucleotidreduktion in einer höheren Pflanze vor. Mit den unter 2. und 3. geschilderten Erfahrungen und experimentellen Schwierigkeiten läßt sich im nachhinein verstehen, warum Kenntnisse dieses wichtigen Biosynthesewegs in höheren Pflanzen noch so spärlich sind. Eine Arbeit¹⁰³ war bekannt, in der das Markierungsmuster von Desoxyribose und Ribose in keimenden Weizenembryonen mit [¹⁴C]Glucose-Einbauversuchen untersucht wurde. Als Resultat wurde gefunden, daß auch in der pflanzlichen Zelle - wie in der bakteriellen und tierischen - der Pentoseanteil der Nucleinsäuren aus dem oxidativen und nicht-oxidativen Kohlenhydrat-Stoffwechsel stammt. Andeutungen über Experimente mit Ribose-1-¹⁴C und ihre direkte Reduktion zu 2-Desoxyribose blieben unbelegt.

Als Ausgangsmaterial für unsere Versuche wählten wir Embryonen keimender Weizensamen (*Triticum aestivum*), weil - wie eingangs ausführlich erörtert wurde - zahlreiche Untersuchungen über die Biosynthese von Nucleinsäuren und ihre zeitliche Abfolge in dieser Kulturpflanze vorlagen. Gleichzeitig war zu erwarten, daß nach Keimbungsbeginn bzw. Aufhebung von G_0 die Zellen den ersten Zellzyklus teilweise synchron durchlaufen, was zu einem verstärkten Auftreten des induzierbaren Enzyms führen sollte. Dagegen kann nicht - wie gehofft - schon auf Grund des hohen DNA-Gehalts von hexaploidem Weizen ($2n = 6x = 42$) mit einem rascheren Wachstum bzw. erhöhter DNA-Syntheserate gerechnet werden. Neuere Untersuchungen von Davies & Rees¹⁰⁴ zeigen nämlich, daß die Dauer des mitotischen Zellzyklus in sechs *Triticum*-Species eine Korrelation zum Kern-DNA-Gehalt aufweist. Danach ist eine Verlängerung des Zellzyklus bei *Triticum aestivum* gegenüber diploidem und tetraploidem Weizen sowohl durch eine längere S-Phase als auch G_1 -Phase bedingt, während G_2 und die Teilungsphase unbeeinflusst bleiben. G_1 - und S-Phase müssen aber für die de novo-Synthese der Ribonucleotidreduktase - wie für eine DNA-Polymerase aus Weizen¹⁶ bestätigt wurde - die entscheidende Zeit sein. Ferner muß mit zunehmender Polyploidie mit einer Vielfalt genetischer Regulationsphänomene gerechnet werden, wie erste Untersuchungen¹⁰⁵ an Phosphodiesterase-Isoenzymen aus Weizen gezeigt haben. Auch wir fanden bei unseren Experimenten zum Ribonucleotidreduktase-Nachweis in verschiedenen alten Weizensamen starke Hinweise für eine komplizierte Regulation dieser Enzymaktivität, auf die an späterer Stelle noch ausführlich einzugehen sein wird.

4.2 Charakterisierung der Weizen-Ribonucleotidreduktase

Alle bekannten Ribonucleotidreduktasen kommen in geringer Menge vor, sind schwierig zu handhaben und sind nicht sehr stabile Proteine. Hinzu kommen Schwierigkeiten bei der quantitativen Enzymbestimmung, die gewöhnlich nur mit Hilfe von Isotopenmarkierung möglich ist. In dieser Arbeit ist es nicht gelungen, Ribonucleotidreduktase aus Weizen mit konventionellen Methoden wie Ammoniumsulfat-Fällung, Gelchromatographie oder Dialyse zur Entfernung endogener niedermolekularer Substanzen anzureichern bzw. zu reinigen. Geringe Stabilität kennzeichnen auch die Enzyme aus Hefe⁶² und Tumorzellen¹⁰⁶; bei Hefe führten selbst erste Reinigungsschritte zu kaum erhöhter Enzymstabilität, was die Anreicherung zusätzlich erschwerte. Als rasch durchführbare Methode zur Enzymanreicherung für derartig empfindliche Proteine, die zudem gegenüber klassischen Methoden meist bessere Ausbeuten liefert, gilt die Affinitätschromatographie. Sie wurde für die Ribonucleotidreduktase aus *Lactobacillus*¹⁰⁷ und T₄-Phagen¹⁰⁸ erfolgreich angewandt. Heyne¹⁰⁹ chromatographierte Weizenextrakte über Aminophenyl-ATP-Sepharose, konnte jedoch im Eluat die Enzymaktivität nicht mehr nachweisen. Wahrscheinlich war dieses von der Reinigung der T₄-Ribonucleotidreduktase übernommene Säulenmaterial ungeeignet, denn bessere Erfolge wurden mit Aminohexyl-dATP-Sepharose an Extrakten der Alge *Scenedesmus* erzielt¹¹⁰; eine Anwendung dieses (schwierig zu präparierenden) Säulenmaterials für Weizenextrakte steht noch aus.

Die sowohl papierchromatographisch als auch säulenchromatographisch bestimmten geringen Umsatzraten (0,2 % = 2 pMol/mg Protein x Std) von Nucleosiddiphosphaten (CDP, ADP) zu Desoxyribonucleosidphosphaten durch Rohextrakte aus älteren Weizenembryonen sind durchaus mit den in anderen Systemen gefundenen vergleichbar. In erster Linie sind die Resultate mit *Vicia faba* und *Glycine max*⁴¹ zu nennen, wo unter ähnlichen Bedingungen nach einer Ammoniumsulfat-Fällung Umsätze zwischen 0,3 und 0,5 % erzielt wurden. Aber auch andere, später bis zur

Homogenität gereinigte bzw. angereicherte Reduktasen zeigen im Rohextrakt niedrige Umsatzraten; beispielsweise *E. coli* ¹¹¹ 60 pMol/mg Protein x Std. und Rattenleber ¹¹² 100 pMol/mg Protein x Std. Erstaunlich hoch sind die Umsätze in Rohextrakten aus den Grünalgen *Scenedesmus* und *Chlorella* ⁴⁴. Sie betragen etwa 5 % und lassen sich wohl nur durch die in diesen Pflanzenzellen mögliche Synchronisierung des Wachstums erreichen.

Eine Charakterisierung der Ribonucleotidreduktase aus Weizen nach Spezifität und Typ war aus den oben genannten Gründen nur mit Rohextrakten durchführbar und muß daher als vorläufig gelten. Wir fanden Ribonucleotidreduktase stets in der löslichen Fraktion, so daß es sich höchst wahrscheinlich um eine cytoplasmatische Enzymaktivität handelt. Hinweise auf membrangebundenes Vorkommen, wie Elford ¹¹³ in vorläufigen und nicht weiter bestätigten Experimenten mit Novikoff-Tumor- und Leberzellen der Ratte postulierte, konnten nicht gefunden werden.

Triphosphate sind keine besseren Substrate als Diphosphate (Tab. 1); und die letztgenannte Verbindung resultiert vermutlich aus Triphosphat durch die in allen Weizenextrakten feststellbare hohe Phosphatase-Aktivität. Daraus muß geschlossen werden, daß das pflanzliche Enzym wie das *E. coli*-Enzym und die Reduktasen aus Eukaryonten, einschließlich der Grünalgen, eine Ribonucleosiddiphosphatreduktase (Typ I, s. 1.2) ist. Typisch für diese Enzyme ist, daß sie ATP und Eisenionen benötigen. ATP wurde im Reduktasetest mit Weizenextrakten routinemäßig auf Grund seines stimulierenden Effektes zugesetzt; ebenso Eisenionen, deren stimulierender Effekt jedoch nicht so ausgeprägt war. Sowohl der hohe endogene Eisengehalt der Embryonen als auch die Möglichkeit, daß es sich wie bei der Grünalge *Scenedesmus obliquus* ⁴⁴ um sehr fest proteingebundenes Eisen handeln könnte, würde die Eisenbedürftigkeit der Weizenreduktase im Test mit Rohextrakt maskieren. Bei Entzug der

Eisenionen durch Komplexbildner wie Hydroxyharnstoff ist jedoch ein Rückgang der Enzymaktivität zu verzeichnen, der in vitro eindeutig als Hemmung der Ribonucleotidreduktase verstanden werden muß. Das Coenzym B₁₂-abhängige Lactobacillus-Enzym (Typ II, s. 1.2) zeigt keine solche Hemmbarkeit durch Hydroxyharnstoff. Andererseits konnten wir keine B₁₂-Abhängigkeit des Weizenenzym feststellen, was nicht verwunderlich ist, wenn man bedenkt, daß höhere Pflanzen weder dieses Vitamin enthalten noch benötigen. Unter den niederen Pflanzen ist dagegen die Grenze der B₁₂-Abhängigkeit für Ribonucleotidreduktion noch immer ungewiß.

Die Reduktion des Substrats CDP war streng abhängig von der Gegenwart eines Dithiols wie Dithiothreit als Ersatz für einen physiologischen Wasserstoffdonor (Abb. 3). Als solcher kann in verschiedenen Organismen Thioredoxin nachgewiesen werden. E. coli-Thioredoxin hat sich als Lieferant für Reduktionsäquivalente bei den Ribonucleotidreduktasen aus Lactobacillus¹¹⁴ und Hefe⁶² bewährt, ist aber für die Reduktase aus Weizen inaktiv. Diese Tatsache zusammen mit dem Befund, daß bei unseren in vivo-Nucleosideinbauversuchen die Radioaktivität der DNA immer mit der UV-Absorption des hochmolekularen Weizen-DNA-Peaks zusammenfiel (s. 3.2.1), zeigen, daß die Resultate der in vitro- und in vivo-Experimente nicht durch eine immerhin denkbare Beteiligung von Mikroorganismen verfälscht sind. (Auch bei Untersuchungen von Rejman & Buchowicz⁷² war das Markierungsmuster von RNA, DNA und Protein das gleiche, wenn die Weizenkörner unter sterilen bzw. nicht-sterilen Bedingungen angekeimt wurden).

Der Nachweis eines homologen thioredoxin-ähnlichen Wasserstoffübertragungssystems im Weizen war bis heute nicht zweifelsfrei möglich, da einerseits die geringe Ribonucleotidreduktase-Aktivität einen homologen Test erschwert oder fast ausschließt und andererseits hohe Aktivität einer unspezifischen Proteindisulfidreduktase vorliegt, die den kolorimetrischen Test auf spezifische Thiole stört¹¹⁵. In dem günstigeren Ausgangsmaterial

der einzelligen Grünalge *Scenedesmus* liegt dagegen nach Untersuchungen von Wagner¹¹⁵ ein Thiothiothion vor. Allerdings muß nach neuesten Befunden an *E. coli*¹¹⁶ sogar die Beteiligung von Glutathion und einem weiteren Protein, "Glutathion", als Reduktionsmittel für die Biosynthese der Desoxyribotide in Betracht gezogen werden; doch läßt sich heute noch nicht absehen, welche relative Bedeutung Thiothiothionen und Glutathion allgemein zukommt.

4.3 Zeit- und Altersabhängigkeit

Wir fanden in vitro Ribonucleotidreduktase-Aktivität in handisolierten Embryonen älterer Erntejahrgänge um 20 Stunden nach Beginn der Keimung. Auch die in vivo-Einbauversuche mit Cytidin an isolierten Embryonen älterer Weizen-samen zeigen einen massiven Einbau dieses Nucleosids (via Reduktion, S. 3.2.2) in die DNA zum selben Zeitpunkt. Damit stehen unsere Befunde in gutem Einklang mit Untersuchungen anderer Autoren. So fand Buchowicz, daß mit dem Beginn der DNA-Synthese und Eintritt der Zellen in die S-Phase zwar bereits nach 6 Stunden zu rechnen ist, diese aber nach 24 Stunden zum Beginn der ersten Zellteilung abgeschlossen sein muß (s. Abb. 2). Auch Untersuchungen an einer DNA-Polymerase aus Weizen zeigen, daß die de novo-Biosynthese des Enzyms zwischen 0 und 6 Stunden beginnt (vermutlich am Ende dieser Periode) und bis 18 Stunden kontinuierlich weitergeht. Im krassen Gegensatz zu den Experimenten mit Weizenembryonen älterer Erntejahre stehen die Beobachtungen an frischen Weizensamen. Mit solchen Extrakten konnte zu keinem Zeitpunkt - unter sonst gleichen Bedingungen - in vitro Ribonucleotidreduktion festgestellt werden. Die in vivo DNA-Markierungsversuche mit Cytidin verdeutlichen diesen Unterschied noch zusätzlich, obwohl - zunächst überraschend - der Thymidin-Einbau in die Weizen-DNA in beiden Fällen bis 18 Stunden völlig identisch ist. Da jedoch nach den dTTP-Bestimmungen der Gehalt dieses DNA-Vorläufers in den untersuchten Samen verschiedener Ernte-

jahre nicht nennenswert differierte, muß geschlossen werden, daß bei Zugabe von radioaktivem Thymidin der interne dTTP-Pool in beiden Fällen die gleiche spezifische Aktivität erreicht und die gemessene in die DNA eingebaute Radioaktivität die wahre Situation in der Zelle widerspiegelt. Die Resultate der Thymidin-Einbauversuche sind so ebenfalls zusätzlich gesichert.

Ein hoher intrazellulärer ATP-Spiegel wird als signifikantes Kennzeichen der frühen Embryokeimung angesehen und für die Stimulierung zahlreicher Stoffwechselprozesse - wie Bildung von Polysomen für die Proteinbiosynthese¹²⁶ und Translation präexistenter mRNA⁹ - in Betracht gezogen. ATP ist aber auch als Effektor der Ribonucleotidreduktase aus in vitro-Tests bekannt. Unterschiede bei der ATP-Bildung könnten daher die oben diskutierten in vivo und in vitro gemachten Beobachtungen an Weizenembryonen verschiedenen Alters zumindest teilweise erklären. Daher bestimmten wir die endogene ATP-Menge in ungekeimten und gekeimten Embryonen für die bei uns verwendeten Weizensorten. In guter Übereinstimmung mit den ATP-Messungen von Obendorf & Marcus¹⁰² fanden wir nach 20 Stunden Keimung einen mindestens 25-fach erhöhten ATP-Gehalt (Tab.16). Eine signifikante Abhängigkeit der ATP-Werte vom Alter des Weizens konnte dagegen nicht festgestellt werden, so daß etwaige Unterschiede in der energetischen Situation und der damit verknüpften metabolischen Aktivität als Erklärung für die ausgeprägten in vivo und in vitro beobachteten Unterschiede zwischen frischen und alten Samen nicht in Betracht kommen.

Bis heute weiß man nur wenig über Prozesse, durch welche eukaryotische Organismen die DNA-Replikation regulieren. Die Tatsache, daß bereits in einem frühen Keimstadium sowohl ATP- und RNA-Synthese beobachtet wird als auch dNTP vorliegen (s. 4.4), zeigt, daß weder das Fehlen von Purin- und Pyrimidinbasen noch eine verminderte Phosphorylierungskapazität oder Fehlen von DNA-Vorläufern ein ausreichender Grund sein können, die DNA-Synthese zu be-

grenzen bzw. auf die S-Phase zu beschränken. Inhibitoren der Ribonucleotidreduktase könnten in diesem Zusammenhang als wichtige Faktoren eines Differenzierungsprozesses angesehen werden und Regulationsphänomene erklären. Solche Inhibitoren sind für Hefe⁶² und den Pilz *Achlya*⁹⁰ beschrieben worden. In beiden Fällen handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen mit Nucleotidcharakter, die aus den Zellextrakten durch Gelchromatographie abgetrennt und isoliert werden konnten. Mehrere Inhibitorfraktionen aus *Achlya* wurden näher charakterisiert und erwiesen sich als phosphorylierte Dinucleotide. Sie hemmten in Ribonucleotidreduktase-Tests mit Extrakten aus Hamsterzellen (CHO-Zellen) die CDP-Reduktion zu 80 %; das *E. coli*-Enzym dagegen nur zu 10 %. Im Weizen haben wir schon früher³⁹ die Existenz eines Ribonucleotidreduktase-Inhibitors in frischen Samen vermutet und seine Existenz durch das in 3.2.2 beschriebene Markierungsexperiment erhärtet: Zusatz eines aus frischen Körnern gewonnenen Extraktes zu keimenden alten Samen unterdrückt den Ribonucleosideinbau in DNA sehr stark, während beispielsweise der Thymidin-Einbau nicht nennenswert beeinträchtigt wird. Der Nachweis, daß es sich um einen auch in vitro aktiven, spezifischen Ribonucleotidreduktase-Inhibitor handelt, gelang allerdings erst, als Schimpff und Follmann⁹⁸ zeigen konnten, daß die gleiche Fraktion auch Ribonucleotidreduktase aus *E. coli* hemmt; mit diesem etwas weniger aufwendigen Aktivitätstest wurde die Verbindung inzwischen weiter fraktioniert und charakterisiert. Die Aktivität ist hitzestabil, aber durch Säure und Alkali sowie wahrscheinlich durch nucleolytische Enzyme zu zerstören; das Spektrum (λ_{max} 257 nm) spricht für eine Nucleinsäure, doch ist stets auch Protein nachzuweisen. Gelfiltration und Dialyseverhalten sprechen für eine Molekülgröße im Bereich $> 5000 < 25\,000$ (tRNA). Im Gegensatz zu den oben erwähnten Inhibitoren läßt sich die inhibierende Fraktion somit durch einfache Gelchromatographie oder Dialyse der Weizenextrakte nicht vollständig entfernen. Diese Befunde können im nachhinein unsere bei der Suche

nach Ribonucleotidreduktase-Aktivität in frischen Weizen-samen gemachten negativen Erfahrungen erklären (s. 3.1.2). Der Wirkungsmechanismus und die physiologische Funktion des Inhibitors im Weizen selbst bleiben allerdings noch unbekannt, insbesondere ob er beim Altern der Samen abgebaut oder deaktiviert wird oder ob er nur eine Komponente eines komplexeren Regulationsapparates ist, dessen Funktionsfähigkeit beim Altern in anderer Weise beeinträchtigt ist. Da die aktive Substanz recht stabil zu sein scheint, ist man geneigt die zweite Möglichkeit zu bevorzugen. Auf jeden Fall bietet sich hier ein neuer Zugang zur Untersuchung der in alten und frischen Samen existierenden unterschiedlichen Stoffwechselsituationen.

Durch Vernalisation ganzer Karyopsen einer neuen Ernte konnte zum ersten Mal auch in solchen Extrakten Ribonucleotidreduktase-Aktivität in vitro nachgewiesen werden. Niedrige Temperatur während des Wachstums beeinflusst jedoch den ganzen Metabolismus, wie Untersuchungen der Atmung sowie des Stoffwechsels von Kohlenhydraten, Proteinen und Nucleinsäuren zeigen. Obgleich sich zahlreiche Berichte besonders mit den durch eine Kältebehandlung hervorgerufenen Veränderungen der Nucleinsäuren beschäftigen, ist ihre Wirkung im einzelnen keineswegs geklärt. Allerdings gilt als sicher, daß gegenüber nachgewiesenen qualitativen Änderungen keine quantitativen vorhanden sind, wenn in Betracht gezogen wird, daß bei vernalisierten Proben eine im Vergleich zum normalen Keimprozess reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit vorliegt. Direkte Hinweise auf einzelne veränderte Proteine, die unter Kontrolle der Nucleinsäuren synthetisiert werden, existieren gegenwärtig nicht. Eine Entscheidung, ob Vernalisation einen spezifischen oder allgemeinen Einfluß auf die Ribonucleotidreduktion im Weizen hat, bleibt zukünftigen Experimenten vorbehalten, die im Gegensatz zu den hier verwendeten ganzen Karyopsen, bereits vorisolierte Embryonen für die Kältebehandlung vorsehen müssen. Damit kann erstens eine aus vernalisierten Weizenkörnern äußerst schwierige Handisolierung

der Embryonen umgangen werden; zweitens fanden Ishikawa & Usami¹¹⁷ auch bei isolierten Embryonen einen [³²P]Einbau in Nucleinsäuren und eine bedeutende Zunahme des DNA-Gehaltes; vorausgesetzt es war während der Vernalisationsperiode Glucose im Medium vorhanden.

4.4 Die physiologische Bedeutung des Desoxy- ribotid-Pools

Mit Ausnahme des Mononucleotids dCMP, dessen Desaminierung zu dUMP eine gewisse Rolle bei der Regulation der dTTP- und dCTP-Synthese spielen könnte, gilt in vielen Organismen als sicher, daß die Triphosphate die vorherrschende Form aller Desoxyribonucleotide in der Zelle sind. Die Messung der intrazellulären dNTP-Pools sollte damit unabhängig von unseren in vivo- und in vitro-Experimenten Aufschluß über die Möglichkeit zur DNA-Synthese in verschiedenen alten Samen geben. Wir haben die dATP- und dTTP-Gehalte von Weizenembryonen bestimmt. Derartige Untersuchungen sind noch an keiner höheren Pflanze vorgenommen worden, so daß zum Vergleich nur die bis heute analysierten, in der folgenden Tabelle zusammengestellten Systeme - vorzugsweise Gewebekulturen von Säugetierzellen - herangezogen werden können.

Wie man erkennt, sind die dATP- und dTTP-Mengen, die man bei einigen anderen Organismen gefunden hat, größenordnungsmäßig mit den aus Weizenextrakten erhaltenen vergleichbar. Das gilt im besonderen für nicht-virus-infizierte HeLa-Zellen und Yoshida-Ascitestumorzellen. Der größere dTTP-Gehalt von Yoshida-Zellen sowie eine nach Herpes simplex-Infektion von HeLa erhöhte dTTP-Spiegel scheint dagegen ein Charakteristikum für Tumorzellen zu sein. Aber auch die dATP- und dTTP-Pools von Zellen der Maus und des Hamsters weisen keine signifikanten Unterschiede zu denen von Weizenembryonen auf, vor allem wenn man bedenkt, daß die Resultate mit teilsynchronisierten bzw. synchronisierten Zellen erzielt wurden (siehe z. B. hoher dTTP-Gehalt von Hamsterzellen nach Synchronisation mit Thymidin), während man bei dem hier

Organismus	dATP	dTTP	dGTP	dCTP	Einheit	Literatur
L929-Zellen der Maus	15	20	17	17	pMol/10 ⁶ Zellen	123
Chlamydomonas	4	5	0,5	2	pMol/10 ⁶ Zellen	48
Lymphocyten (Mensch) nicht-stimuliert	0,25	0,035	-	-	pMol/10 ⁶ Zellen	36
PHA-stimuliert	4	9	-	-	"	
Seeigellei	140 · 10 ⁶	70 · 10 ⁶	14 · 10 ⁶	100 · 10 ⁶	pMol/μg DNA	85
Physarum polycephalum	11	19	9	19	"	91
Tetrahymena pyriformis	5	10	5	3	"	46
Yoshida-Ascitestumorzellen	1,6	10	0,8	1,3	"	35
HeLa-Zellen nicht infiziert	0,5	1	0,4	0,2	"	101
nach Herpes Virus-Infektion	0,8	7,8	0,6	0,4	"	
B ₁₂ -defiziente Zellen von Euglena gracilis	0	0,06	0	0	"	47
Euglena gracilis + B ₁₂	1,7	2,6	0,2	1,3	"	
Embryonale Zellen d. Maus	0,5 - 3	0,5-4	0,1-0,5	1-10	"	124
CHO-Zellen (S-Phase)	3,4	3,1	0,76	10,4	"	125
Hamsterzellen (S-Phase) (+ dt)	27	104	10	76	pMol/10 ⁶ Zellen	22
" (durch mitotische Selektion synchronisiert)	2-4	2-4,5	0,1-0,4	10-50	pMol/μg DNA	79
Weizenembryonen	0,2-1	0,2-1	-	-	pMol/μg DNA	

verwendeten Pflanzenmaterial nur von einer natürlichen, sehr unvollständigen Synchronisation im ersten Zellzyklus sprechen kann. Bemerkenswert ist, daß wir im Gegensatz zu der in vitro gemessenen Ribonucleotidreduktase-Aktivität und den in vivo mit Cytidin durchgeführten DNA-Markierungsexperimenten keine nennenswerten Unterschiede in den dATP- und dTTP-Pools fanden, wenn ältere und frische Weizensamen verwendet wurden.

Allerdings beziehen sich die erwähnten Versuche auf Cytidinderivate, während der dCTP-Pool in Weizenextrakten nicht bestimmt wurde. Man muß damit rechnen, daß diese Tatsache von größerer Bedeutung ist als bisher erwartet und möglicherweise den Vergleich der einzelnen Resultate dieser Arbeit einschränkt. Untersuchungen an Fibroblasten der Maus¹¹⁸ und Hamsterzellen (CHO-Zellen)³⁷ zeigen nämlich, daß alle dNTP zunehmen, wenn die Zellen DNA synthetisieren; aber nur der dCTP-Pool steigt parallel zur zellulären DNA-Syntheserate. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, daß dem dCTP-Pool eine spezielle regulatorische Funktion bei der DNA-Synthesegeschwindigkeit zukommt. Mit Zellmutanten von Mäusefibroblasten¹¹⁹, die eine Ribonucleotidreduktase mit veränderten regulatorischen Eigenschaften besitzen, wurden diese Befunde erst kürzlich bestätigt. Schließlich sind sogar in tierischen Geweben während des Zellzyklus unterschiedliche Aktivitäten von CDP- und ADP-Reduktase postuliert worden¹²⁰. Aus nicht näher erläuterten Gründen war es Grzelczak & Buchowicz⁸⁷ - im Gegensatz zu den anderen Basen und Nucleosiden - nicht möglich, Cytosin und Cytidin in ungekeimten und gekeimten Weizensamen nachzuweisen. Ob dies ein Hinweis ist, daß auch in Pflanzenzellen Cytidin- und Desoxycytidinnucleotide einer besonderen Regulation unterworfen sind und eine Beziehung zu der von uns beobachteten Altersabhängigkeit der stoffwechselphysiologischen Situation besteht, kann auf der Grundlage der hier aufgeführten Experimente noch nicht entschieden werden.

Mit einer dCTP-Poolbestimmung in verschiedenen alten Weizen-samen könnte das Problem gleichwohl von einer anderen Seite angegangen werden. Solche Untersuchungen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Wir haben bei unseren Experimenten zum Nachweis der Ribonucleotidreduktase aus Weizen fast ausschließlich mit Cytosinderivaten gearbeitet, weil sie mehrere Vorteile gegenüber den anderen Nucleosiden und Nucleotiden besitzen: Für den in vitro-Test kommt bei geringen Enzymaktivitäten nur die empfindlichste und zuverlässigste Analysenmethode in Frage, und als solche gilt immer noch das auf Trennung von CMP und dCMP beruhende säulen-chromatographische Verfahren. Hovemann & Follmann¹²² haben dies durch Vergleich mehrerer bekannter und neu entwickelter Trennmethode speziell für Pflanzenextrakte gezeigt. Auch für die in vivo-Versuche wurde Cytidin bevorzugt, weil nur dieses Ribonucleosid auf eindeutigem Wege und mit brauchbarer spezifischer Aktivität in DNA gelangt. Adenosin ist für derartige Experimente ungeeignet, da die in der Zelle entstehenden Adenosinnucleotide viele endogene Pools durchlaufen und zu den unterschiedlichsten Syntheseleistungen herangezogen werden.

Nur auf der Basis einer ausgezeichneten Synchronisation des Zellwachstums können Rückschlüsse gezogen werden, ob der Beginn der DNA-Synthese durch Produktion von Desoxyribonucleotiden initiiert wird oder umgekehrt der Beginn der DNA-Replikation zur gesteigerten Bildung von Desoxyribonucleotiden Anlaß gibt. In keinem bis heute bekannten Fall konnte diese Frage mit Sicherheit beantwortet werden. Da jedoch in einigen Zellen wie Tetrahymena und Seeigelleiern nachweisbare endogene dNTP-Pools während des ganzen Zellzyklus existieren, scheint es unwahrscheinlich, daß nicht-vorhandene DNA-Synthese ausschließlich auf das Fehlen von DNA-Vorläufern zurückzuführen ist. Auch wir

fanden bereits nach 2 Stunden Keimung meßbare Mengen beider dNTP (ca. 0,2 pMol/ μ g DNA), obwohl dATP und dTTP in trockenen, ungekeimten Weizenembryonen mit Sicherheit nicht vorhanden sind und ein Einbau von radioaktivem Thymidin in säureunlösliches Material erst nach 5 Stunden beobachtet werden kann. Dieses Resultat läßt keine Entscheidung zu, ob es sich bei den gemessenen dNTP um Produkte der de novo-induzierten Ribonucleotidreduktase (durch Translation gespeicherter bzw. neu-synthetisierter mRNA) handelt. Denkbar ist vielmehr auch, daß nach 2 Stunden Phosphorylierungsprodukte bereits vorliegender Desoxyribonucleoside bzw. Desoxyribonucleotide nachgewiesen werden, da in Weizenembryonen schon nach 30 Minuten Keimung eine Zunahme der Atmung, des ATP-Gehalts und damit eine hohe Phosphorylierungskapazität vorhanden ist. Im Gegensatz zu Untersuchungen über freie Purin- und Pyrimidinribonucleoside in keimenden Weizensamen ⁸⁷ liegt keine Information über Desoxyribonucleoside in einem frühen Keimstadium vor; ihr Nachweis dürfte sich allerdings wegen der geringen Menge dieser Verbindungen recht schwierig gestalten, da empfindliche und spezifische Bestimmungsmethoden nicht bekannt sind. Eine erst kürzlich beschriebene Methode erlaubt die Messung von Desoxyribonucleosidmonophosphat (dCMP) und -diphosphat (dCDP) in pMolen. Die Desoxyribonucleotide werden zu diesem Zweck vor Einsatz in den DNA-Polymerase-Test zu dCTP mit Hilfe von dCMP-Kinase und/oder NDP-Kinase phosphoryliert. Vorläufige Befunde mit teilsynchronisierten Myoblasten der Maus ¹²¹ zeigen, daß im Gegensatz zu dCTP in ruhenden Zellen kein dCMP vorliegt. Interessant und erwähnenswert ist hier, daß dCMP- und dCTP-Poolgröße sich nicht parallel zur DNA-Synthese ändern. Während dCMP vor dem Beginn der DNA-Replikation akkumuliert, erfolgt eine Zunahme von dCMP erst nach dem Maximum des dCTP-Pools. Eine Anwendbarkeit dieser Methode auf Weizenextrakte scheint derzeit allerdings noch fraglich, da die dNTP-Gehalte von

Mäusemyoblasten um eine Größenordnung höher liegen und der komplizierte Test mit mehreren Hilfsenzymen nur Desoxycytidindi- und-monophosphatmengen von größer als 0,5 pMol/ μ g DNA erfaßt.

5. Zusammenfassung

1. In vitro wird Ribonucleotidreduktase erstmals für ein pflanzliches System, und zwar in gekeimten, handisolierten Weizenembryonen aus längere Zeit trocken gelagerten Samen nachgewiesen. Es handelt sich um eine Diphosphatreduktase vom Typ I, wie sie in fast allen eukaryotischen Zellen vorliegt. Eine Anreicherung und Reinigung war nicht möglich. Die Substratreduktion in Rohextrakten war gering und ließ sich unter vielen getesteten Bedingungen nicht steigern.
2. Die Bildung eines unbekannten Nucleotids im Reduktasetest mit Weizenextrakten wird beobachtet. Es erweist sich im Gegensatz zu früheren Vermutungen als Neben- und nicht als Zwischenprodukt der Reduktion.
3. Überraschenderweise ist die Enzymaktivität in frischen Weizensamen nicht zu finden. Dagegen tritt sie nach 14-tägiger Vernalisation ganzer Karyopsen auf.
4. DNA-Markierungsexperimente in vivo mit dem Ribonucleosid Cytidin belegen den reduktiven Biosyntheseweg für Desoxyribotide in Weizen und bestätigen die in vitro erhaltenen Resultate. In völliger Übereinstimmung mit der beobachteten Altersabhängigkeit des Enzymnachweises zeigen aus frischen Samen isolierte Embryonen während der Keimung nur minimale Ribonucleosideinbau-raten gegenüber gealterten Samen, während der Thymidineinbau vergleichbar stark ist. Es gibt Hinweise auf die Existenz eines spezifischen Ribonucleotidreduktase-Inhibitors in frischen Samen.

5. In Extrakten keimender Weizenembryonen werden die intrazellulären dATP- und dTTP-Pools mit Hilfe der DNA-Polymerase-Reaktion enzymatisch bestimmt. In ungekeimten Samen sind keine Desoxyribonucleosid-triphosphate nachzuweisen, in keimenden werden Mengen von maximal 1 pMol/ μ g DNA gefunden. Einen altersbedingten Unterschied der dATP- und dTTP-Gehalte gibt es nicht.
6. Die Ergebnisse werden im Vergleich mit tierischen Geweben diskutiert. Es steht fest, daß Desoxyribonucleotide nicht allein als Reduktase-Produkte und Replicase-Substrate anzusehen sind, vielmehr scheinen ihre Bildung und ihr zeitliches Auftreten zahlreichen Regulationsphänomenen unterworfen zu sein und sie selbst wiederum regulatorische Funktionen auszuüben. Aus diesem Grund lassen sich gegenwärtig in pflanzlichen Zellen noch keine kausalen Zusammenhänge zwischen Ribonucleotid-reduktase-Aktivität, dNTP-Konzentration und DNA-Synthese erkennen, die für ein umfassendes Verständnis der auf molekularbiologischer Ebene ablaufenden Prozesse bei Zellwachstum und Zellvermehrung notwendig wären.

6. Literaturverzeichnis

1. Mitchinson, J. M., (1971): "The Biology of the Cell Cycle", Cambridge University Press, Cambridge
2. Howard, A., Pelc, S. R., (1953) Heredity, Suppl. 6, 261-273
3. Lajtha, L. G. (1963) J. Cell Comp. Physiol., 62, 143-145
4. Jakob, K. M., Bovey, F. (1969) Exp. Cell Res., 54, 118-126
5. Dobrzanska, M., Tomaszewski, M., Grzelczak, Z., Rejman, E., Buchowicz, J., (1973) Nature 244, 507-508
6. Chen, D., Schultz, G. A., Katchalski, E., (1971) Nature New Biol. 231, 69-72
7. Stoddardt, J. L., Thomas, H., Robertson, A. (1973) Planta 112, 309-321
8. Kedes, L. H., Gross, P. R. (1969) J. Mol. Biol. 42, 559-575
9. Weeks, D. P., Marcus, A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 232, 671-684
10. Taneja, S. R., Sachar, R. C. (1976) Phytochem. 15, 1589-1594
11. Mazus, B., Brodniewicz-Proba, T. (1976) Acta Biochimica Polonica 23, 261-267
12. Spiegel, S., Obendorf, R. L., Marcus, A. (1975) Plant Physiol. 56, 502-507
13. Swatzen, P., Payne, J., Osborne D. J. (1975) Biochem. J. 148, 381-387
14. Rejman E., Buchowicz, J. (1973) Phytochemistry 12, 271-276
15. Dobrzanska, M., Buchowicz, J. (1976) Biochim. Biophys. Acta 432, 73-79
16. Mory, Y. Y., Chen, D., Sarid, S. (1975) Plant Physiol. 55, 437-442
17. Müller, H. (1973) Diplomarbeit, Marburg
18. Racker, E. (1952) J. Biol. Chem. 196, 347-365
19. Rose, I. A., Schweigert, B. S. (1953) J. Biol. Chem. 202, 635-645

20. Reichard, P. (1968) Eur. J. Biochem. 3, 259-266
21. Moore, E. C. (1969) Cancer Res. 29, 291-295
22. Walters, R. A., Tobey, R. A., Ratliff, R. L. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319, 336-347
23. Theiss, J. C., Fischer, G. A. (1976)
Biochem. Pharmacology 25, 73-79
24. Blakley, R. L. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2173-2180
25. Gleason, F. K., Wood, J. M. (1976)
J. Bacteriology 128, 673-676
26. Gleason, F. K., Hogenkamp, H. P. C. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 4894-4899
27. Brown, N. C., Reichard, P. (1969)
J. Mol. Biol. 46, 25-39
28. Moore, E. C., Hurlbert, R. B. (1966)
J. Biol. Chem. 241, 4802-4809
29. Follmann, H. (1974) Angew. Chem. 86, 624-634
30. Hogenkamp, H. P. C., Sando, G. (1974) in
Structure and Bonding, Springer Verlag, 20, 23-58
31. Werner, R. (1971) Nature New Biol. 233, 99-103
32. Lindberg, U., Skoog, L. (1970)
Anal. Biochem. 34, 152-160
33. Skoog, L. (1970) Eur. J. Biochem. 17, 202-208
34. Reichard, P., Canellakis, Z. N., Canellakis, E. S.
(1961) J. Biol. Chem. 236, 2514-2519
35. Liss, E., Brammer, S., Schmidt, H. (1973)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 682-686
36. Munch-Petersen, B., Tyrsted, G., Dupont, B.
(1973) Exptl. Cell Research 79, 249-256
37. Bjursell, G., Reichard, P. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 3904-3909
38. Walters, R. A., Ratliff, R. L. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 414, 221-230
39. Müller, H., Wahl, R., Kuntz, I., Follmann, H.
(1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1299-1303
40. Prescott, D. M. (1976) "Reproduction of Eucaryotic
Cells", Academic Press, N. Y.
41. Hovemann, B. (1976) Dissertation, Marburg

42. Lowdon, M., Vitols, E. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 158, 177-184
43. Gleason, F. K., Hogenkamp, H. P. C. (1972) Biochim. Biophys. Acta 277, 466-470
44. Feller, W., Follmann, H. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 752-758
45. Sullivan, C. W., Volcani, B. E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 308, 205-211
46. Nexø, B. A. (1975) Biochim. Biophys. Acta 378, 12-17
47. Carell, E. F., Goetz, G. H. (1976) Biochem. J. 156, 473-475
48. Knutsen, G., Lien, T., Skoog, L. (1973) Exptl. Cell Res. 83, 442-445
49. Johnston, F. B., Stern, H. (1957) Nature 179, 160-161
50. Reichard, P. (1958) Acta Chem. Scand. 12, 2048
51. Stern, H. (1968) in Methods Enzymol. XIIb, 105-111 (Colowick, S., Kaplan, N., eds) Academic Press, N. Y.
52. Willard, J. M., Davis, J. J., Wood, H. G. (1969) Biochem. 8, 3137-3144
53. Richardson, C. C., Schildkraut, C. L., Aposhian, H. V., Kornberg, A. (1954) J. Biol. Chem. 239, 222-231
54. Hill, B. T., Whatley, S. (1975) FEBS Letters 56, 20-23
55. Hill, B. T. (1976) Anal. Biochem. 70, 635-638
56. Singh, J., Siminovitch, D. (1976) Anal. Biochem. 71, 308
57. Chowdhury, K., Chakravorty, B., Kerr, I., Neogy, R. K. (1976) Indian J. Biochem. Biophys. 13, 84-86
58. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, E. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
59. Trayer, I. P., Trayer, H. R., Small, D. A. P., Bottomley, R. C. (1974) Biochem. J. 139, 609-623
60. Fitt, P. S., Peterkin, P. I., Grey, V. L. (1976) J. Chromatog. 124, 137-140
61. Kimmich, G. A., Randles, J., Brand, J. S. (1975) Anal. Biochem. 69, 187-206
62. Vitols, E., Bauer, V. A., Stanbrough, E. C. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 71-77

63. Villiers, T. A. (1974) Plant Physiol. 53, 875-878
64. Bray, C. M., Chow, T. (1976) Biochim. Biophys. Acta 442, 14-23
65. Bray, C. M., Dasgupta, J. (1976) Planta 132, 103-108
66. Sen, S., Osborne, D. J. (1974) J. Exptl. Botany 25, 1010-1019
67. Osborne, D. J. (1976) in Nature 264, 215
68. Dell'Aquila, A., Zocci, G., Lanzani, G. A.
De Leo, P. (1976) Phytochemistry 15, 1607-1610
69. Teraoka, H. (1967) Plant & Cell Physiol. 8, 87-95
70. Sen, S. (1975) Naturwissenschaften 62, 184-185
71. Bayliss, M. W. (1973) Nature 246, 529-530
72. Rejman, E., Buchowicz, J. (1971)
Phytochemistry 10, 2951-2957
73. Kern, H., Grübler, J. (1976) Z. Naturforsch. 31c, 104-107
74. Völksch, B., Augsten, H. (1975)
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 443-452
75. Moore, E. C. (1967) in Methods Enzymol. XIIa,
155-164 (Grossmann, L., Moldave, K., eds.)
Academic Press N. Y.
76. Evans, L. T. (1971) Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 365-394
77. Devey, M. (1963) in "Symposium on Genetics and
Wheat Breeding", 17-40
78. Teraoka, H. (1973) Plant & Cell Physiol. 14, 1053-1061
79. Skoog, K. L., Nordenskjöld, B. A., Bjursell, K. G.
(1973) Eur. J. Biochem. 33, 428-432
80. Deng, Q-J., Ives, D. H. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 277, 235-244
81. Yadav, S. P. (1976) Planta 129, 87-89
82. Cantoni, G. L., Davies, D. R., eds. (1971)
Proc. Nucl. Acid. Res. 2, 455, Harper & Row, N. Y.
83. Lonberg-Holm, K. K. (1967) Nature 213, 454-457
84. Solter, A. W., Handschumacher, R. E. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 174, 585-590

85. Mathews, Chr., K. (1975) Exptl. Cell Res. 92, 47-56
86. Ikuma, H., Tetley, R. M. (1976) Plant Physiol. 58, 320-323
87. Grzelczak, Z., Buchowicz, J. (1975) Phytochemistry 14, 329-331
88. Cole, C. V., Ross, C. (1966) Anal. Biochem. 17, 526-539
89. Sigel, H., Amsler, P. E. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98, 7390-7400
90. Lewis, W. H., McNaughton, D. R., Le John, H. B., Wright, J. A. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 128-135
91. Fink, K. (1975) Biochim. Biophys. Acta 414, 85-89
92. Osawa, S., Sibatani, A. (1967) in Methods Enzymol. XIIa, 678-684 (Grossmann, L., Moldave, K. eds) Academic Press N. Y.
93. Balzer, F. (1975) Dissertation, Marburg
94. Chargaff, E. (1955) "The Nucleic Acids" Bd. 1, 220 (Academic Press)
95. Hammarsten, E., Reichard, P., Saluste, E., (1950) J. Biolog. Chem. 183, 105-109
96. Swindlehurst, M., Berry, S. J., Firshein, W. (1971) Biochim. Biophys. Acta 228, 313-323
97. Tondeur-Six, N., Tencer, R., Brachet, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 395, 41-47
98. Schimpff, G., Follmann, H. (1977) unveröffentlicht
99. Lennon, M. B. Suhadolnik, R. J. (1976) Biochim. Biophys. Acta 425, 532-536
100. Hoffmann, G. (1974) Staatsexamensarbeit, Marburg
101. Cheng, Y. C., Goz, B., Prusoff, W. H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 390, 253-263
102. Obendorf, R. L., Marcus, A. (1974) Plant Physiol. 53, 779-781
103. Fan, M. L., La Croix, L. J., Unrau, A. M. (1969) Biochemistry 8, 4083-4086
104. Davies, P. O. L., Rees, H. (1975) Heredity 35, 337-345

105. Wolf, G., Rimpau, J. (1977) Natur 265, 470-471
106. Blakley, R. L., Vitols, E. (1968) Ann. Rev. Biochem. 37, 201-224
107. Hoffmann, P. J., Blakley, R. L. (1975) Biochemistry 14, 4804-4812
108. Berglund, O., Eckstein, F., (1972) Eur. J. Biochem. 28, 492-496
109. Heyne, W. (1975) Staatsexamensarbeit, Marburg
110. Pries, M. (1976) Diplomarbeit, Marburg
111. Reichard, P., Baldesten, A., Rutberg, L. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1150-1157
112. Larsson, A. (1969) Eur. J. Biochem. 11, 113-121
113. Elford, H. L. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 163, 537-543
114. Beck, W. S. Goulian, M., Larsson, A., Reichard, P. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2177-2179
115. Wagner, W. (1975) Diplomarbeit Marburg, Dissertation in Vorbereitung
116. Holmgren, A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2275-2279
117. Ishikawa, K., Usami, S. (1975) Plant & Cell Physiol. 16, 109-117
118. Skoog, K. L., Bjursell, K. G., Nordenskjöld, B. A. (1973) Adv. Enzyme Regul. 12, 345-354
119. Meuth, M., Aufreiter, E., Reichard, P. (1976) Eur. J. Biochem. 71, 39-43
120. Peterson, D. M., Moore, E. C. (1976) Biochim. Biophys. Acta 432, 80-91
121. Brynolf, K. (1976) Anal. Biochem. 72, 238-247
122. Hovemann, B., Follmann, H. (1977) Anal. Biochem. 79, im Druck
123. Adams, R. L. P., Berrymann, S., Thomson, A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 240, 455-462
124. Skoog, L., Nordenskjöld, B. (1971) Eur. J. Biochem. 19, 81-89

125. Skoog, L., Bjursell, G. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6434-6438
126. Marcus, A., Feeley, J., Volcani, T. (1966) Plant Physiol. 41, 1167-1172

Herrn Prof. Dr. H. Follmann danke ich
herzlich für seine fortwährende Hilfs-
bereitschaft in jeglicher Hinsicht.

Lebenslauf

Am 8. Juli 1948 wurde ich in Leonberg/Baden-Württemberg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1955 bis 1959 trat ich in das naturwissenschaftliche Gymnasium in Leonberg ein, wo ich 1967 das Abitur ablegte. Am Ende desselben Jahres begann ich das Chemiestudium an der Universität Stuttgart. Seit dem Sommersemester 1969 studiere ich an der Philipps-Universität in Marburg.

Nach dem Diplomexamen im April 1972 fertigte ich im Fachgebiet Biochemie die Diplomarbeit an.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann in der Zeit von Oktober 1973 bis Dezember 1976 in der Abteilung Biochemie des Fachbereichs Chemie.

